

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



551 052

(43) 国際公開日  
2004 年 10 月 7 日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/085606 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12M 3/00, (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004077
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 24 日 (24.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-081148 2003 年 3 月 24 日 (24.03.2003) JP  
特願2003-081147 2003 年 3 月 24 日 (24.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人国立環境研究所 (NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES) [JP/JP]; 〒3058506 茨城県つくば市小野川 1 6 - 2 Ibaraki (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 持立 克身 (MOCHITATE, Katsumi) [JP/JP]; 〒3050032 茨城県つくば市竹園 3 - 1 0 8 - 4 0 4 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL CULTURE MEDIUM AND SOLIDIFIED PREPARATION OF CELL ADHESION PROTEIN OR PEPTIDE

(54) 発明の名称: 細胞培養基質および細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品

(57) Abstract: It is intended to provide a cell culture medium surface-coated with a hydrophobic-bonding adsorptive polymer which is efficiently adsorbed to cell culture instruments such as a culture dish and shows a favorable cell adhesion reproducibility; a solidified preparation of a cell adhesive protein or peptide which efficiently binds to the cell culture medium and shows a favorable cell adhesion reproducibility; and an artificial tissue obtained by inoculating the solidified preparation of the cell adhesion peptide with cells and culturing the cells.

(57) 要約: 本発明は、培養皿等の細胞培養基質に効率よく吸着し、細胞接着の再現性に優れた、細胞培養基質表面に疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされている細胞培養基質、および、該細胞培養基質に効率よく結合し、細胞接着の再現性に優れた細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品、更には、該細胞接着ペプチドの固相化標品上に細胞を播種し、培養することにより調製される人工組織を提供するものである。

WO 2004/085606 A1

## 明 細 書

細胞培養基質および細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品

## 5 技術分野

本発明は、細胞培養基質表面が疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされている細胞培養基質および該細胞培養基質に結合した細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品、更には、該固相化標品上に細胞を播種し、培養することにより調製される人工組織に関する。

10

## 背景技術

動物の体の内外の表面を覆っている細胞層である表皮、角膜上皮、肺胞上皮、消化器系の粘膜上皮、腎臓子球体上皮、肝実質細胞等の上皮組織は、外界からの異物（微生物、アレルゲン、化学物質等）が侵入するのを防いでいる。かかる上皮組織を構成する上皮細胞の外界面は上端面（apical surface）、内側下面は基底面（basal surface）と呼ばれ、かかる基底面直下には、蛋白質やプロテオグリカン等の細胞外基質（ECM）から成る細胞を含まない基底膜と呼ばれる50～100nmの薄膜の構造体が存在する。基底膜は、未成熟な上皮細胞が増殖し、成熟した細胞に分化して、本来の形態や、機能を発現するのに必須の構造体と考えられている。即ち、基底膜なしでは上皮組織は自分自身の維持や本来のパフォーマンスが達成できない。多層または単層の上皮細胞層はバリアーとして外界からの異物の侵入を防いでいるが、基底膜自体も物理的なバリアーとして作用する。このように、上皮組織を構成する上皮細胞と基底膜が協働して、強固なバリアーを形成し、体内の生命活動を保護している。

上皮細胞の他、内皮細胞、筋細胞、脂肪細胞、シュワン細胞などの実質細胞と結合組織との界面に形成される細胞外基質の特異な膜状構造物である基底膜は、生体の各組織・臓器に普遍的に見出される一方で、腎系球体毛細血管ループや神経シナプス膜など高度に特化したものもある。

5 したがって、基底膜には細胞を間質に接着させるだけでなく、選択的な物質・細胞透過や細胞分化の誘導等の機能があることが明らかにされている。腎系球体では、基底膜の陰性荷電が腎のろ過機能を担っているとみなされ、その陰性荷電は現在パールカンとよばれるヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）によることが古典的に知られている。HSPGは腎系球体基底膜だけでなく、種々の基底膜に、IV型コラーゲン、ラミニン、エンタクチン（ニドジェン）等と同様に、その基本的構成分子として広く分布している。

細胞外マトリックス、特に基底膜は、上記のように個体の発生や分化等の生理現象だけでなく、癌の増殖転移や炎症などの病態形成にも深く  
15 関与していることが明らかとなりつつあり、その構成タンパク質の機能の解明が重要な課題となってきた。例えば、基底膜の主要糖タンパク質であるラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3種類のサブユニットからなる複合体で、15種類のアイソフォームが知られており、これらが組織特異的あるいは発生時の各段階で特異的に発現している。ラミニンは様々な  
20 生物活性を有している分子量約90万の複雑な巨大分子である。ラミニンのリセプターとしては、 $\alpha 6 \beta 1$ 等のインテグリン分子、 $\alpha$ -ジストグリカン（ $\alpha$ -DG）、シンデカン-1～4のヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）が報告されている。

細胞が接着可能な薄い細胞外マトリックス層である基底膜の構成成分  
25 と上皮細胞との相互作用が、移動、増殖および分化等の細胞機能に影響を及ぼしている（Crouch et al., Basement membrane. In The Lung (ed. R.

G. Crystal and J. B. West), pp53.1-53.23. Philadelphia :

Lippincott-Raven. 1996)。基底膜の主要成分としては、前記のように、ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) およびエンタクチン (ニドジェン) が知られており (Curr. Opin. Cell Biol., 6, 674-681, 1994)、ラミニン及びIV型コラーゲンのアイソフォームを含む基底膜成分の合成には、間充織細胞が重要な役割を担っていると考えられている (Matrix Biol., 14, 209-211, 1994; J. Biol. Chem., 268, 26033-26036, 1993) が、上皮細胞の役割もまた、重要なものである。HSPGは、上皮細胞由来と考えられているが、ラミニン、IV型コラーゲンおよびエンタクチン (ニドジェン) は、上皮細胞および間充織細胞の双方によって、インビボで合成される (Development, 120, 2003-2014, 1994; Gastroenterology, 102, 1835-1845, 1992)。連続した緻密層 (lamina densa) を示すインビトロでの上皮組織モデルを作製する試みが、今まで数多く行われてきた。腸 (J. Cell Biol., 133, 417-430, 1996) および皮膚 (J. Invest. Dermatol., 105, 597-601, 1995; J. Invest. Dermatol., 109, 527-533, 1997; Dev. Dynam., 197, 255-267, 1993) 等の組織モデルが研究されており、いくつかの間充織細胞由来基底膜成分が、基底膜形成に重要な役割を果たしていることも見い出されている。

従来から、上皮細胞を培養することにより基底膜を構築し、基底面直下に基底膜構造体が存する上皮組織を構築する幾つかの方法が報告されている。例えば、本発明者は、肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養によりインビトロで基底膜が形成されることを報告した (Cell Struc. Func., 22: 603-614, 1997)。すなわち、肺線維芽細胞をI型コラーゲンゲルに包埋した状態で培養すると、肺線維芽細胞によってコラーゲンゲルは収縮し、堅さを増す。また、肺線維芽細胞から分泌された細胞外基質は、細胞周囲のコラーゲン線維にまとわりついて沈着する。そ

の形成物はインビボにおける間質と類似することから、擬似間質と呼ぶことができる。肺線維芽細胞からは、ラミニン、IV型コラーゲン、パールカン、エンタクチン（ニドジェン）等の基底膜構成成分も、培地中に分泌される。この擬似間質化したI型コラーゲン線維上で、肺胞2型上皮細胞株（SV40-T2）を14日間程度培養する（T2-Fig 1）と、肺線維芽細胞から分泌された基底膜構成成分が、上記肺胞2型上皮細胞株の基底面にまで拡散・到達し、基底膜構築の材料として使われる結果、基底膜構造体が形成されることを報告した。

また、希薄な中性コラーゲン溶液を、5%CO<sub>2</sub>中37℃でインキュベートし、コラーゲン線維を形成させた後、無菌状態の中で風を当てて乾燥させた風乾コラーゲン線維基質（fib）を、上記擬似間質の代替物として用い、上記肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養の場合と同様にして、基底膜を形成することも報告されている（Eur. J. Cell Biol., 78: 867-875, 1999; J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000）。この方法の場合、コラーゲン溶液の濃度が高いと、形成されたコラーゲン線維に隙間が少なく、あるいは無くなって、基底膜形成のため上皮細胞を長期間培養（10日～2週間）すると、細胞が剥がれて浮き上がることから（例：Becton Dickinson, Fibrillar collagen coat culture insert）、コラーゲン溶液濃度は、0.3～0.5mg/mlが最適であるとされている（Eur. J. Cell Biol., 78: 867-875, 1999; J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000）。

線維芽細胞を包埋したコラーゲンマトリックスを使用する代わりに、マトリゲル（Matrigel; Becton Dickinson社の登録商標）を共存させ、コラーゲン線維基質上で肺胞2型上皮細胞株（SV40-T2）を培養した。このときマトリゲルは、基底膜成分の外來性（exogenous）供給源として機能した。マトリゲルは、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍マトリッ

クスから抽出された基底膜調製物であり (J. Exp. Med., 145, 204-220, 1977)、ECM合成に影響を及ぼす可能性のある種々のサイトカインの他に、ラミニン-1、エンタクチン (ニドジェン)、IV型コラーゲン、パールカンを含んでいる (Exp. Cell Res., 202, 1-8, 1992)。基底膜  
5 に取り込まれたマトリゲル由来の成分を追跡するために、マトリゲルを  
ピオチンで標識した。標識された基底膜成分の中でも、主としてラミニ  
ン-1とエンタクチン (ニドジェン) が培地中に拡散し、肺胞上皮細胞  
が形成する基底膜中に取り込まれた。また、基底膜成分を免疫蛍光染色  
し (蛍光) 顕微鏡で観察すると、マトリゲル量に依存して基底膜形成が  
10 促進すること、および点状に分泌・沈着された基底膜マトリックス成分  
がシート状に拡大し、やがて基底膜へと発達して行く過程が観察された。  
これらの結果から、肺胞上皮細胞の基底面下方から供給された外来性ラ  
ミニン-1およびエンタクチン (ニドジェン) が、インビトロでの上記  
上皮細胞による完全な基底膜の形成に大きく関与していることが明らか  
15 になっている (J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000)。

また、細胞をインビトロで付着させ、培養する方法として、疎水性組  
織培養表面に生体分子をジスルフィド結合で結合させた末端基活性化ポ  
リマー (EGAP) に吸着させ、細胞を生体分子が結合したEGAPコ  
ート表面上に播種し、増殖させる方法が開示されている (特表2001  
20 -512565; WO98/31734)。

培養細胞が基質に接着する際には、細胞表面に存在するインテグリン  
等のリセプター分子を使って接着するのが一般的である。このため、細  
胞が特異的なリセプターを使って基質に接着することを誘導するには、  
細胞接着活性を有する細胞外基質等がリンカーとして利用される。細胞  
25 外基質には、代表的なものとしてフィブロネクチン (FN)、コラーゲン  
(C $\alpha$ 1)、ラミニン (LN) およびビトロネクチン (VN) 等の細胞接

着蛋白質が知られている。これら細胞接着蛋白質は、プラスチック培養皿との疎水結合を利用して、直接非共有結合で吸着させ、これらの上に上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞等を播種させ、細胞培養を行うための基質として利用されている。しかし、これら細胞接着蛋白質は高価な上、蛋白質の一般的性質である変成や分解を受け易く、価格、安定性や保存性等に問題を有している。

また、細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドを上記と同様の方法を用いてプラスチック培養皿に直接吸着させ、細胞培養の基質として用いることが出来る。これら細胞接着蛋白質に比して、容易に化学合成できるペプチドを細胞接着ペプチドとして用いる方法は、大量生産が容易である点や、構造が比較的安定なことから、細胞接着基質に用いる利点がある。しかし、低分子故にその吸着効率は蛋白質に比して著しく低く、数パーセント程度しか吸着しない。また、ペプチドにとっても、プラスチックに吸着されて運動の自由度を奪われている状態では、細胞側の受容体と結合するのが難しい。また、一旦吸着したペプチドも、その後、徐々に遊離する。従って、ペプチドを用いた細胞接着の再現性は芳しくなく、工業製品としての価値は低い。

本発明者らは、培養細胞が基質に接着することを誘導するために、細胞培養に用いる親水性処理をしたプラスチック製培養皿に代わって、細胞接着のリガンド（リセプターの結合相手となる細胞外基質分子）で培養皿の疎水性表面をコーティングする方法を見いだし、本発明を完成するに至った。この方法は、細胞接着の受け手であるリガンドとそのリガンドを固相化するための相手となる培養皿が、非共有結合（疎水結合）で結合することを利用する方法である。

即ち、本発明は、培養皿等の細胞培養基質に効率よく吸着し、細胞接着の再現性に優れた、細胞培養基質表面に疎水結合性吸着ポリマーでコ

ーティングされている細胞培養基質、および、該細胞培養基質に効率よく結合し、細胞接着の再現性に優れた細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品、更には、該細胞接着ペプチドの固相化標品上に細胞を播種し、培養することにより調製される人工組織を提供することにある。

5

## 発明の開示

すなわち本発明は、分子内に疎水性を有する直鎖状骨格と蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基とを有している疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされていることを特徴とする細胞培養基質（請求の範囲

10 1）や、細胞培養基質の基材が、生物性ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物または金属からなる請求の範囲 1 記載の細胞培養基質（請求の範囲 2）や、生物性ポリマーが、コラーゲン、ゼラチン、セルロース、アガロース、アルギン酸、キチン、キトサン、または、生

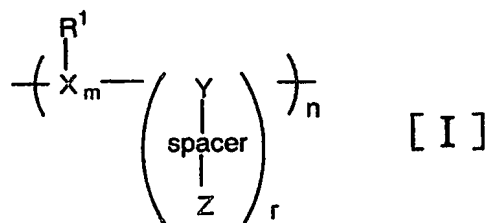
15 分解性ポリマーのポリ乳酸、ポリブチレンサクシネート、ポリカプロラクトンである請求の範囲 2 記載の細胞培養基質（請求の範囲 3）や、プラスチックが、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂である請求の範囲 2 記載の細胞培養基質（請求の範囲 4）や、熱可塑性樹脂が、アクリル樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリメチルペンテン樹脂またはフッ素樹脂である請求の範囲

20 4 記載の細胞培養基質（請求の範囲 5）や、熱硬化性樹脂が、フェノール樹脂、尿素樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂またはシリコン樹脂である請求の範囲 4 記載の細胞培養基質（請求の範囲 6）や、合成ゴムが、ブタジエンスチレングム、ブタジエンアクリロニトリルゴム、ブチルゴム、多硫化系合成ゴム、フッ素ゴムまたはシリコンゴムである請求の範囲

25 2 記載の細胞培養基質（請求の範囲 7）や、無機物が、ガラス、ヒドロキシアパタイト、IC 基材またはカーボンナノチューブである請求の範



図 2 記載の細胞培養基質（請求の範囲 8）や、金属が、不活性（i n e  
 r t）な金、白金、チタン、インジウム、または、これらの酸化物である  
 酸化チタン、酸化インジウム、ITO（酸化インジウム・スズ）である  
 請求の範囲 2 記載の細胞培養基質（請求の範囲 9）や、請求の範囲 2  
 5 ～ 9 記載の基材からなる細胞培養基質が、培養皿（ウェル）、プリント配  
 線板または人工臓器である請求の範囲 1 記載の細胞培養基質（請求の範  
 囲 1 0）や、人工臓器が、人工血管、人工心肺または人工腎臓である請  
 求の範囲 1 0 記載の細胞培養基質（請求の範囲 1 1）や、細胞培養基質  
 が、シリコンゴムを基材とした培養皿（ウェル）である請求の範囲 1 ま  
 10 たは 1 0 記載の細胞培養基質（請求の範囲 1 2）や、疎水結合性吸着ポ  
 リマーが、以下の式 [ I ] で表される請求の範囲 1 ～ 1 2 のいずれか記  
 載の細胞培養基質



（式中、X は、CH または NHCHCO を示し、Y は、CH または NH  
 15 CR<sup>2</sup>CO を示し、R<sup>1</sup> は、H、炭素数 1 ～ 1 0 のアルキル基、炭素数 1  
 ～ 1 0 のアルコキシ基、炭素数 6 ～ 1 0 のアリールもしくはアラアルキ  
 ル基または炭素数 6 ～ 1 0 のアリールオキシもしくはアラアルキルオキ  
 シ基を示し、R<sup>2</sup> は、H または炭素数 1 ～ 1 0 のアルキル基を示し、Z  
 は、官能基（反応基）を示し、X と互に結合してもよく、spacer は、（  
 20 CH<sub>2</sub>）<sub>p</sub> または（-NHCHR<sup>3</sup>CO-）<sub>q</sub> を示し、R<sup>3</sup> は、H または炭  
 素数 1 ～ 1 0 のアルキル基を示し、m は、1 以上の整数を、n は、1 0

0～20000の整数を、pおよびqは、独立して0または1～8の整数を、rは、1以上の整数を示す）（請求の範囲13）、式[I]で表される疎水結合性吸着ポリマーが、ビニル系化合物と無水マレイン酸との共重合体である請求項13記載の細胞培養基質（請求の範囲14）や、

5 ビニル系化合物が、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、ブチルエーテル、ヘキシルビニルエーテルまたはスチレンである請求の範囲14記載の細胞培養基質（請求の範囲15）に関する。

また、本発明は、細胞接着蛋白質またはペプチドが、請求の範囲1～15のいずれか記載の細胞培養基質に結合していることを特徴とする細胞

10 細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品（請求の範囲16）や、結合が、疎水結合性吸着ポリマー分子内の蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドの反応性基とが反応し形成される共有結合である請求の範囲16記載の固相化標品（請求の範囲17）や、共有結合が、アミド結合である請求の範囲17記載の固相化標品（請求の範囲18）や、細胞接着蛋白質が、フィブロネクチン（FN）、コラーゲン（Col）、ラミニン（LN）またはビトロネクチン（VN）である請求の範囲16～18のいずれか記載の固相化標品（請求の範囲19）や、細胞接着ペプチドが、請求の範囲19記載の細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドである請求の範囲1

20 6～18記載の固相化標品（請求の範囲20）や、フィブロネクチン（FN）蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドが、細胞側のインテグリン受容体と結合する特異的なArg-Gly-Asp（RGD）アミノ酸配列を有するペプチドである請求の範囲20記載の固相化標品（請求の範囲21）や、RGDアミノ酸配列を有するペプチドが、Tyr-Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser（FIB-1）である請求の範囲21記載の固相

25

化標品（請求の範囲22）や、ラミニン（LN）蛋白質の細胞接着に関  
わる領域のペプチドが、 $\alpha$ 鎖のG領域（G-domain）ペプチドで  
ある請求の範囲20記載の固相化標品（請求の範囲23）や、G領域ペ  
プチドが、Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln  
5 -Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (AG73)、Leu-Gln-Gln-Arg-Arg-Ser-Val-Leu-Arg-Thr-Lys-Ile (AG73T)、Thr-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Gly-Arg-Leu-His-Phe-Met (AG76.8)、Thr-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Gly-Arg-Leu-His-Phe-Nle (AG76.8X)、  
10 Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Met (AG81.2)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Nle (AG81.2X)、Lys-Asn-Arg-Leu-Thr-Ile-Glu-Leu-Glu-Val-Arg-Thr (A2G73)、Lys-Pro-Arg-Leu-Gln-Phe-Ser-Leu-Asp-Ile-Gln-Thr (A3G72)、Lys-Phe-Leu-Glu-Gln-Lys-Ala-Pro-Arg-Asp-Ser-His (A4G73)、Gly-Glu-Lys-Ser-Gln-Phe-Ser-Ile-Arg-Leu-Lys-Thr (A4G78)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (A4G82)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Nle (A4G82X)、Gly-Pro-Leu-Pro-Ser-Tyr-Leu-Gln-Phe-Val-Gly-Ile (A5G71)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Le

u-Ser-Met-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73)、  
Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Nle-  
Leu-Val-Arg-Pro (A5G73X)、Leu-Val-L  
eu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His-Phe-V  
5 al-Ala (A5G77)、Leu-Val-Leu-Phe-Leu  
-Asn-His-Gly-His (A5G77f)、Lys-Asn-  
Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Tyr-Leu-Ser-  
Lys-Gly (hA3G75) または Gly-Asn-Ser-Th  
r-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Ty  
10 r (hA3G83) である請求の範囲 23 記載の固相化標品 (請求の範  
囲 24) や、細胞接着ペプチドが、3~20 個のアミノ酸残基からなる  
ペプチドである請求の範囲 20 記載の固相化標品 (請求の範囲 25) や、  
細胞培養基質にコーティングした疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質また  
はペプチドと反応しうる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドとを反  
15 応させることを特徴とする固相化標品の製造方法 (請求の範囲 26) や、  
疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基と  
細胞接着蛋白質またはペプチドとを反応させ、該反応物を細胞培養基質  
にコーティングすることを特徴とする固相化標品の製造方法 (請求の範  
囲 27) や、疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応し  
20 うる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドとを反応させて得られる反  
応物 (請求の範囲 28) に関する。

さらに、本発明は、請求の範囲 16~27 のいずれか記載の細胞接着  
蛋白質またはペプチドの固相化標品上に目的とする細胞を播種し、培養  
することにより調製されることを特徴とする人工組織 (請求の範囲 29)  
25 や、目的とする細胞が、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞である請  
求の範囲 29 記載の人工組織 (請求の範囲 30) や、上皮細胞が、表皮

細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子  
球体上皮細胞または肝実質細胞である請求の範囲 30 記載の人工組織  
(請求の範囲 31) や、内皮細胞が、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、  
肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞または大動脈血管内皮細胞  
5 である請求の範囲 30 記載の人工組織 (請求の範囲 32) や、間充織細  
胞が、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞または神経細胞 (ニ  
ューロン) である請求の範囲 30 記載の人工組織 (請求の範囲 33) や、  
人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人  
工気道上皮組織、人工腎系球体組織、人工肝実質組織もしくは人工血管  
10 内皮組織、または人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚もし  
くは人工角膜である請求の範囲 29 ~ 33 のいずれか記載の人工組織  
(請求の範囲 34) に関する。

#### 図面の簡単な説明

15 第 1 図は、疎水結合性吸着ポリマーの MMA C を用いて細胞外マトリ  
ックス蛋白質および細胞接着ペプチドを固相化したシリコンウェル上で、  
肺胞 2 型上皮細胞 (T 2 細胞) を静置培養した結果形成された肺胞上皮  
組織の位相差顕微鏡写真を示した写真である。

第 2 図は、MMA C を用いて細胞外マトリックス蛋白質および細胞接  
20 着ペプチドを固相化したシリコンウェル上で、T 2 細胞を伸展培養した  
結果形成された肺胞上皮組織の位相差顕微鏡写真を示した写真である。

第 3 図は、培養皿に塗布・固相化した細胞外マトリックス蛋白質に対  
する T 2 細胞の接着が、遊離の当該細胞接着ペプチドにより阻害される  
ことを示した図である。

25 第 4 図は、MMA C を用いて固相化した細胞接着ペプチド基質に対す  
る T 2 細胞の接着、およびその接着が遊離の当該細胞接着ペプチドによ

り競争阻害を受けることを示した図である。

第5図は、疎水結合性吸着ポリマーのMASTを用いて固相化した細胞接着ペプチド基質に対するT2細胞の接着、およびその接着が遊離の当該細胞接着ペプチドにより競争阻害を受けることを示した図である。

5 第6図は、MMACを用いて固相化した細胞接着ペプチド上におけるT2細胞の細胞接着、伸展の様子を微分干渉顕微鏡で撮影した写真である。

第7図は、MMACを用いて固相化した細胞接着ペプチド基質に対するT2細胞の接着が、ヘパリンによって阻害を受けることを示した図である。  
10

第8図は、固相化細胞接着ペプチド基質に対するT2細胞の接着は、お互いに遊離ペプチドで競争阻害を受ける場合と一方的に競争阻害を受ける場合があることを示した図である。

第9図は、固相化したFIB-1ペプチドに対するT2細胞の接着結合力（親和性、affinity）を基準にした場合、固相化したLNの細胞接着ペプチドの親和性は、FIB-1と同程度のものから100倍高いものまで広範囲に亘ることを示した図である。  
15

第10図は、無血清培地で1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈し、培養皿に吸着・固相化させた偽似マトリックスMBAC-peptideに対するT2細胞の接着、およびその接着が遊離の当該細胞接着ペプチドにより競争阻害を受けることを示した図である。  
20

第11図は、無血清培地で1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈し、培養皿に吸着・固相化させた偽似マトリックスMAST-peptideに対するT2細胞の接着、およびその接着が遊離の当該細胞接着ペプチドにより競争阻害を受けることを示した図である。  
25

第12図は、無血清培地で1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈し、培養

皿に吸着・固相化させた偽似マトリックスMBAC-peptideを当該ペプチドに対するポリクローナル抗体で処理すると、T2細胞の接着が特異的に阻害されることを示した図である。

第13図は、無血清培地で1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈し、培養  
5 皿に吸着・固相化させた偽似マトリックスMBAC-peptideをヘパリンで処理すると、T2細胞の接着が特異的に阻害されることを示した図である。

第14図は、無血清培地で1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈し、培養  
10 皿に吸着・固相化させた偽似マトリックスMBAC-peptideをヘパリンで処理すると、T2細胞の接着が特異的に阻害されることを示した図である。

第15図は、50%エタノールで2-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈して培養皿に50  $\mu\text{l}$ 注ぎ、風乾・固相化させた偽似マトリックスMAST-GRGDSPおよびMMAC-GRGDSPの塗布量(0.1-1.0  $\mu\text{g}/\text{well}$ )に依存して、無血清培地に懸濁したT2細胞の接着量  
15 量が変わることを、FNを塗布した場合を基準として示した図である。

第16図は、50%エタノールで希釈して培養皿に注ぎ、風乾・固相化させた偽似マトリックスMAST-GRGDSP(0.1-1.0  $\mu\text{g}/\text{well}$ )に対するT2細胞の接着が、遊離のGRGDSPペプチドにより競争阻害を受けることを示した図である。  
20

第17図は、50%エタノールで希釈して培養皿に注ぎ、風乾・固相化させた偽似マトリックスMMAC-GRGDSP(0.1-1.0  $\mu\text{g}/\text{well}$ )に対するT2細胞の接着が、遊離のGRGDSPペプチドにより競争阻害を受けることを示した図である。

25 第18図は、50%エタノールで希釈して培養皿に注ぎ、風乾・固相化させた偽似マトリックスMBAC-peptideおよびMAST-

peptide (0.1–1.0  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) に対する T2 細胞の接着が、遊離の当該ペプチドにより競争阻害をうけることを示した図である。

第 19 図は、50% エタノールで希釈して培養皿に注ぎ、風乾・固相  
5 化させた偽似マトリックス MBAC-FIB-1 および MAST-FIB-1 (0.1–1.0  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) を、FIB-1 ペプチドに対するポリクローナル抗体で処理すると、T2 細胞の接着が特異的に阻害されることを示した図である。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

本発明の細胞培養基質は、基材として、例えば、生物製ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物または金属等を使用した細胞培養基質が挙げられる。

生物製ポリマーとしては、コラーゲン、ゼラチン、セルロース、アガ  
15 ロース、アルギン酸、キチン、キトサン等、または、生分解性ポリマーのポリ乳酸、ポリブチレンサクシネート、ポリカプロラクトン等が例示される。

プラスチックとしては、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂何れの樹脂も使用することができ、熱可塑性樹脂としては、例えば、アクリル樹脂、  
20 ポリ塩化ビニル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリメチルペンテン樹脂またはフッ素樹脂等が、熱硬化性樹脂としては、例えば、フェノール樹脂、尿素樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂またはシリコン樹脂等が例示される。

合成ゴムとしては、例えば、ブタジエンスチレンゴム、ブタジエンア  
25 クリロニトリルゴム、ブチルゴム、多硫化系合成ゴム、フッ素ゴムまたはシリコンゴム等が例示されるが、特に、シリコンゴムが好ましい。



無機物としては、ガラス、ヒドロキシアパタイト、シリコン等の IC 基材またはカーボンナノチューブ等が例示される。

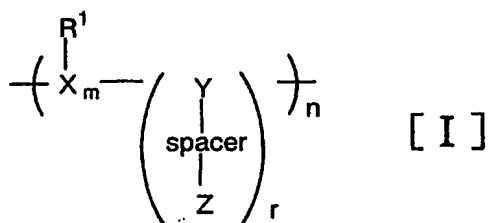
金属としては、不活性（i n e r t）な金、白金、チタン、インジウム、または、これらの酸化物、例えば、酸化チタン、酸化インジウム、

5 ITO（酸化インジウム・スズ）等が例示される。

特にガラスについて、今日の様にプラスチックが汎用される以前は、培養基質としてガラスが使われていた。しかし、接着効率の不安定さや繰り返し使用することによる表面の凹凸等により、現在はプラスチックに取って代わられている。しかし、その光学透明性は、優れた特性であり、本発明は、平坦な表面のガラスまたは表面加工を施したガラスに対しても、適用することができる。

細胞培養基質は、培養皿（ウェル）、プリント配線板または人工臓器等に用いられ、人工臓器としては、人工血管、人工心肺または人工腎臓等が例示される。また、シリコンゴムを基材として作製された培養皿（ウェル）が、好ましく用いられる。

疎水結合性吸着ポリマーとしては、分子内に疎水性を有する直鎖状骨格と蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーであって、以下の式〔I〕



20 (式中、Xは、CHまたはNHCHCOを示し、Yは、CHまたはNHCR<sup>2</sup>COを示し、R<sup>1</sup>は、H、炭素数1～10のアルキル基、炭素数

1 ~ 10 のアルコキシ基、炭素数 6 ~ 10 のアリールもしくはアラアルキル基または炭素数 6 ~ 10 のアリールオキシもしくはアラアルキルオキシ基を示し、 $R^2$  は、H または炭素数 1 ~ 10 のアルキル基を示し、Z は、官能基（反応基）を示し、X と互に結合してもよく、spacer は、  
5  $(-CH_2-)_p$  または  $(-NHCHR^3CO-)_q$  を示し、 $R^3$  は、H または炭素数 1 ~ 10 のアルキル基を示し、m は、1 以上の整数を、n は、100 ~ 20000 の整数を、p および q は、独立して 0 または 1 ~ 8 の整数を、r は、1 以上の整数を示す）で表される。

式 [I] 中、炭素数 1 ~ 10 のアルキル基としては、直鎖または分枝  
10 状のメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等の各基を、炭素数 1 ~ 10 のアルコキシ基としては、直鎖または分枝状のメトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、ヘプチルオキシ、オクチルオキシ、ノニルオキシ、デシルオキシ等の各基を、炭素数 6 ~ 10 の  
15 アリールまたはアラアルキル基としては、フェニル、ナフチル、ベンジル、フェネチル等の各基を、炭素数 6 ~ 10 のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基としては、フェノキシ、ナフトキシ、ベンジルオキシ、フェネチルオキシ等の各基を挙げることができる。

官能基（反応基）としては、蛋白質あるいはペプチドの反応性基と反  
20 応して、結合しうるものであれば特に制限されるものではなく、例えば、カルボキシル基、アミノ基、メルカプト基、水酸基およびこれらの反応性誘導体等を例示することができる。また、カルボキシル基の反応性誘導体としては、酸ハロゲン化物、酸無水物、酸イミド、活性エステル等の反応性誘導体が、アミノ基の反応性誘導体としてイソシアナート基等  
25 を例示することができる。また、酸無水物、酸イミド等は、X と結合して環を形成していても良い。

かかる疎水結合性吸着ポリマーとしては、細胞培養基質表面に吸着することができる疎水結合性吸着ポリマーであって、分子内にポリアルキレン鎖あるいは直鎖状アミノ酸ポリマー（ポリグリシン、ポリアラニン、ポリバリン、ポリロイシン、ポリフェニルアラニン等）やその誘導体などの疎水性の直鎖状骨格をもつ疎水結合性吸着ポリマーで、該疎水性の直鎖状骨格に直接、あるいは、スペーサーを介して蛋白質あるいはペプチドと反応できる反応性の官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーを好適に用いることができる。かかる式〔I〕における $n$ の範囲としては100～2000であり、式〔I〕で表される疎水結合性吸着ポリマーの分子量は15,000～3,200,000程度のものが好ましい。

また、かかる官能基を有する疎水結合性吸着ポリマーとしては、エチレン、プロピレン等のアルキレンもしくはメチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、エチル-1-プロペニルエーテル、ブチルビニルエーテル、ヘキシルビニルエーテル等の不飽和エーテル類またはスチレン等のビニル系化合物や、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン等の $\alpha$ アミノ酸等などから選択できる1種または2種以上と、無水マレイン酸、マレインイミド等の無水カルボン酸、酸イミドや、アクリル酸、アクリルアミド、アクリロニトリル等のオレフィン類や、システイン等のメルカプト基を有するアミノ酸や、セリン、スレオニン等の水酸基を有するアミノ酸や、アスパラギン酸、グルタミン酸等のモノアミノジカルボン酸や、リシン等のジアミノモノカルボン酸など反応基を有するモノマーから選択できる1種または2種以上との共重合体を挙げるることができる。これらの共重合体はそれぞれ二量体、三量体等が相互に重合した共重合体であってもよいが、交互共重合体であることが好ましい。また、反応基を有するモノマーの場合は、これら自身の単縮重合体は、縮合により形成される疎水性の直鎖状骨格

にスペーサーを介せず官能基を有する構造となるため、本発明の官能基を有する疎水結合性吸着ポリマーとして適用することができる。

これらのうちで、本発明の官能基を有する疎水結合性吸着ポリマーとして、無水マレイン酸と、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、  
5 エチル-1-プロペニルエーテル、ブチルビニルエーテル、ヘキシルビニルエーテル、スチレン等のビニル系化合物との共重合体が代表例として例示され、特に、無水マレイン酸とメチルビニルエーテルとの共重合体であるMMAC (methyl vinyl ether / maleic anhydride copolymer)、無水マレイン酸とブチルビニルエーテルとの共重合体であるMBAC (butyl vinyl ether / maleic anhydride copolymer)、無水  
10 マレイン酸とヘキシルビニルエーテルとの共重合体であるMHAC (hexyl vinyl ether / maleic anhydride copolymer) および無水マレイン酸とスチレンとの共重合体であるMAST (styrene / maleic anhydride copolymer) を具体例として挙げる事ができる。かかるポリマーは、通常のオレフィン類の共重合法に準じ合成可能であり、あるいは、  
15 市販品としても入手可能である。

MMAC、MBAC、MHAC等の場合、メチレン基を骨格とする直鎖ポリマーが、細胞培養基質表面に疎水性結合で吸着することを可能にしているが、ポリアルキレン骨格だけだとあまりにも疎水性で、水との  
20 親和性が低くなり、微視的には水をはじいて、反応性に支障がでる可能性がある。そこで、メチレン基の水素原子の一部を上述のように、例えば、メトキシ、ブトキシ、ヘキシルオキシ等のアルコキシ基置換したものは、酸素原子の存在により反応効率が高まると考えられる。なお、アルコキシ基に代えて水酸基で置換すると、分子間で無水カルボン酸とエ  
25 ステル結合を作ることから好ましくない。そして、MMAC、MBAC、MHAC等における反応基である無水マレイン酸は、蛋白質あるいはペ

プチドのアミノ基または水酸基等と反応し、結合することになるが、この無水マレイン酸がたとえ水と反応してカルボン酸になったとしても、蛋白質あるいはペプチドの陽電荷とイオン結合することができる。

5       なお、疎水結合性吸着ポリマーは、使用する細胞培養基質の材質あるいは使用目的により適宜選択される。例えば、前記のMMA C、MBA C、MHAC等は、メチレン骨格を持つポリマーであるが、懸かるポリエチレン、ポリプロピレン等のポリアルキレンを主鎖とするポリマーは柔軟性を有しており、例えば、伸展運動を繰り返すシリコンゴム製培養皿をコーティングする目的には適した素材である。他方、スチレン骨格  
10       を持つMASTは、フェニル基を側鎖に有しているため、電気的性質が優れており、骨格構造は剛直である。この為、例えば、ポリスチレンの様に疎水性が高く堅い基材や、電子特性の優れたカーボンナノチューブ、あるいは電気伝導性の優れた金や白金等の金属や金属酸化物（例えば、ITO）を細胞培養基質として使用する際のコーティングに適している。  
15       そして、上記疎水結合性吸着ポリマーは、疎水性の直鎖状骨格により、化学結合でなく疎水性結合で細胞培養基質表面に吸着されることから、細胞培養基質の種類や材質に関係なく吸着することができる。その理由は、長い主鎖の局所では接着面から乖離することがたとえあるとしても、他の殆どの部分では結合している故に、乖離した部分もそれほど接着面  
20       から離れることはできない。その結果、両者は程なく疎水結合で再度結合し、乖離は一時的なものになると考えられる。細胞接着蛋白質あるいはペプチドが強く疎水結合できない物質であっても、この疎水結合性吸着ポリマーは、その長い疎水性主鎖によって強固に細胞培養基質に結合することができる。

25       細胞培養基質に疎水結合性吸着ポリマーをコーティングする方法としては、予め溶媒に溶解し調製した疎水結合性吸着ポリマー溶液を、細胞

培養基質に塗布し、乾燥させれば良い。疎水結合性吸着ポリマー溶液を細胞培養基質に塗布する場合には、細胞培養基質表面を侵さない溶媒を用いる必要がある。例えば、細胞培養基質としてプラスチックを用い、MMAC、MBAC、MHAC、MASTを塗布する場合、MMAC、  
5 MBACはアセトンに易溶であるが、アセトンはプラスチック表面を侵す。しかし、プラスチックを侵さないn-ヘキサンに対しては、MMAC、MBAC、MHAC、MASTは難溶性である。このため、極性溶媒でプラスチック表面も侵さないエタノールを用いるのがよい。この様に、MMAC、MBACは、エタノールに可溶のため、アセトン等を必  
10 要とするポリマーよりも使い易い上に、塗布後に簡単に風乾できる。また、エタノール溶液等として細胞培養基質表面のコーティング処理に用いる場合のMMAC、MBAC、MHAC、MAST等の濃度としては、  
2  $\mu\text{g}/\text{ml} \sim 1 \text{ mg}/\text{ml}$ 、特に10  $\sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ が好適であり、かかるコーティング処理を所望する接着の程度に応じて1  $\sim 3$  回繰  
15 り返すこともできる。

次に、本発明の細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品は、疎水結合性吸着ポリマーでコーティングした細胞培養基質に細胞接着蛋白質またはペプチドを結合して固定化したものであり、結合は、疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドの反応性基とが反応して形成される共有結合をいう。  
20 共有結合としては、下記に説明する、アミド結合、チオアミド結合、エステル結合およびチオエステル結合等が例示され、特に、アミド結合が好ましい。

ここで、細胞接着蛋白質あるいはペプチドの反応性基としては、蛋白質あるいはペプチドの末端あるいは側鎖由来のカルボキシル基、アミノ  
25 基、メルカプト基、水酸基等を例示することができる。

疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基と細胞接着蛋白質あるいはペプチドの反応性基と反応し結合させる方法は、通常のペプチド合成に用いられている方法が利用できる。例えば、一方のカルボキシル基は、縮合剤の存在下に、あるいは酸ハロゲン化物、  
5 酸無水物、活性エステル等の反応性誘導体として、他方のアミノ基、メルカプト基あるいは水酸基と反応させることが出来、アミド結合、チオアミド結合、エステル結合等の共有結合を形成する。アミノ基は、縮合剤の存在下に、あるいはイソシアナート等の反応性誘導体として、カルボキシル基と反応させ、アミド結合を形成させることが出来る。メルカプト基および水酸基は、主としてカルボキシル基と上記と同様に、縮合剤  
10 あるいはカルボキシル基の反応性誘導体と反応させ、チオエステル結合またはエステル結合を形成させることができる。そして、かかる官能基あるいは反応基に、前記の自己重縮合あるいは疎水性の直鎖状骨格とコポリマーを形成することができる範囲内で、簡単に外れる可逆的な保護  
15 基をつけることもできる。

細胞接着蛋白質としては、フィブロネクチン(FN)、コラーゲン(Col)、ラミニン(LN)およびピトロネクチン(VN)等が挙げられる。

細胞接着ペプチドとしては、上記した細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドであればいずれでも用いることができる。これらペプチドの長さとしては、3～20個、好ましくは  
20 6～15個、より好ましくは6～12個のアミノ酸残基である。

FN蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドとしては、細胞側のインテグリン受容体と結合する特異的なRGDアミノ酸配列を有するペプチドが好ましく、例えば、具体的配列として、Tyr-Ala-Val  
25 -Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser(FIB-1)が例示される。

また、上皮細胞、血管内皮細胞、筋肉細胞、神経細胞（ニューロン）等の機能発現に特に重要と考えられているLN蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドとしては、 $\alpha$ 鎖のG領域（G-domain）ペプチドが好ましく、例えば、マウスのLN由来である、Arg-Lys-A

5 Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (AG73)、Leu-Gln-Gln-Arg-Arg-Ser-Val-Leu-Arg-Thr-Lys-Ile (AG73T)、Thr-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Gly-Arg-Leu-His-Phe-Met (AG76.8)、Thr-Leu  
10 -Gln-Leu-Gln-Glu-Gly-Arg-Leu-His-Phe-Nle (AG76.8X)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Met (AG81.2)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Nle (AG81.2X)、  
15 Lys-Asn-Arg-Leu-Thr-Ile-Glu-Leu-Glu-Val-Arg-Thr (A2G73)、Lys-Pro-Arg-Leu-Gln-Phe-Ser-Leu-Asp-Ile-Gln-Thr (A3G72)、Lys-Phe-Leu-Glu-Gln-Lys-Ala-Pro-Arg-Asp-Ser-His (A4G7  
20 3)、Gly-Glu-Lys-Ser-Gln-Phe-Ser-Ile-Arg-Leu-Lys-Thr (A4G78)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (A4G82)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Nle (A4  
25 G82X)、Gly-Pro-Leu-Pro-Ser-Tyr-Leu-Gln-Phe-Val-Gly-Ile (A5G71)、Arg-A



s n - A r g - L e u - H i s - L e u - S e r - M e t - L e u - V  
a l - A r g - P r o ( A 5 G 7 3 ) , A r g - A s n - A r g - L e u  
- H i s - L e u - S e r - N l e - L e u - V a l - A r g - P r o  
( A 5 G 7 3 X ) , L e u - V a l - L e u - P h e - L e u - A s n -  
5 H i s - G l y - H i s - P h e - V a l - A l a ( A 5 G 7 7 ) また  
は L e u - V a l - L e u - P h e - L e u - A s n - H i s - G l y  
- H i s ( A 5 G 7 7 f ) 等が、また、ヒトLN由来の、L y s - A s  
n - S e r - P h e - M e t - A l a - L e u - T y r - L e u - S e  
r - L y s - G l y ( h A 3 G 7 5 ) または G l y - A s n - S e r -  
10 T h r - I l e - S e r - I l e - A r g - A l a - P r o - V a l -  
T y r ( h A 3 G 8 3 ) 等が例示される。かかる細胞接着ペプチドは、  
通常のパプチド合成法により入手可能である。

細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品は、細胞培養基質に上記  
方法により疎水結合性吸着ポリマーをあらかじめ塗布し、コーティング  
15 した後、該ポリマーの蛋白質またはペプチドの反応しうる官能基と細胞  
接着蛋白質またはペプチドの反応性基とを反応させることにより調製す  
ることが出来る。

反応は、通常のパプチド結合の方法に準じて行えばよいが、例えば、  
細胞培養基質に予めコーティングしたM M A C、M A S T等と細胞接着  
20 ペプチドとの反応は、室温～50℃、好ましくは37℃で、pH7～1  
1の中性ないしアルカリ性で10分～48時間反応させることにより共  
有結合を形成し、固相化させることが出来る。

また、疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる  
官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドの反応性基とを予め反応させ、  
25 該反応物を細胞培養基質に塗布することにより細胞接着蛋白質またはペ  
プチドの固相化標品を調製することも出来る。疎水結合性吸着ポリマー

と細胞接着蛋白質またはペプチドとを予め反応させた反応物(以下、「偽似マトリックス」という)を使えば、細胞培養基質への疎水結合性吸着ポリマーのコーティングと蛋白質またはペプチドの固相化反応の二段階処理で細胞接着基質を固相化していたのが、偽似マトリックスをコーティングする一段階で調製することができる。偽似マトリックスを使用すると、例えば、

a) 培養皿に塗布する工程が簡素化され、工業生産上は有利となる。

b) 培養皿以外の基質にもプリント技術を使えば、吹き付けることにより容易に塗布出来るので、種々の基材が培養基質になる。

10 c) 細胞接着させる部分をプリントし、どの様に種々の細胞と共培養するかデザイン(配置)出来るようになり、丁度、IC回路を設計する感覚で人工組織を構築することができる。

d) 偽似マトリックスは、必ずしも培養液で希釈して培養皿表面に吸着・固相化するだけが唯一の方法では無く、例えば50%エタノールに希  
15 釈して塗布することも出来る。この場合は、風乾しても塩は析出せず、高温での保存性が格段に優れている。

等の利点を有している。

疎水結合性吸着ポリマーと細胞接着蛋白質またはペプチドとの反応、および生成した偽似マトリックスの細胞接着基質への塗布する方法は、  
20 上記の方法に準じて調製することができる。

疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドの反応しうる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドの反応性基との反応は、全ての官能基に対し細胞接着蛋白質またはペプチドの反応性基を反応させる(細胞接着蛋白質またはペプチドの占有率100%)させることも可能であるが、  
25 占有率が、1~50%であるのが好ましく、更に、5~15%であるのがより好ましい。占有率を高めると、蛋白質またはペプチドの水溶性の

ため偽似マトリックスの培養基質への吸着率が下がり、また、エタノール等有機溶媒への溶解度も下がり、析出し易くなってしまう。更に、蛋白質またはペプチドの密度を上げて、細胞の受容体密度が上がらなければ無駄となり、経済的にも好ましくない。

- 5      特に、本発明で得られる固相化ペプチドを中性 pH、37℃で4日間放置しても細胞接着活性に変化は無く、極めて安定である。このことから、細胞接着ペプチドの固相化標品は、種々の培養基質として用いることができ、その性能は、代表的接着蛋白質である FN を直接細胞培養基質に固相化した場合と比較しても、これに十分匹敵する活性を有している。
- 10     る。また、本発明の調製方法によれば、従来、細胞培養基質に直接ペプチドを固相化するには、細胞接着ペプチドの濃度を 2.5 mg/ml 以上にする必要があるが、本発明では 0.25 mg/ml 以下で十分であり、ペプチドの使用量が、従来法の 1/10 ~ 1/100 以下の量でも、効率良く、しかも再現性良く固相化できる。

- 15     また、細胞接着蛋白質を細胞培養基質に直接固相化させる場合には、通常 5 ~ 10  $\mu$ g/ml の濃度で塗布し、通常の静置培養でこれが問題になることはないが、シリコンゴム上で伸展培養する場合には、蛋白質とシリコンゴムとの疎水結合による吸着が弱いために、細胞は大変剥がれ易くなる。これを防ぐには、本発明の MMAC 等を介してシリコンゴムに吸着させる方法が有効な手段となる。
- 20

- 次いで、細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品上に目的とする細胞を播種し、培養することにより人工組織を調製することが出来る。かかる人工組織の製造方法としては、細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品上に目的とする細胞を播種し、培養する方法であれば特に制限されることはなく、固相化標品上に目的の細胞を播種するだけで、播種
- 25     された細胞は接着し、その後速やかに伸展する。培養液に特に血清は必

要ないが、1%程度の低濃度（通常の細胞培養では10%程度使用される）を添加すれば、接着、伸展は更に促進される。

目的とする細胞としては、例えば、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞等を挙げることができ、上皮細胞としては、例えば、表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞または肝実質細胞等を、内皮細胞としては、例えば、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞、大動脈血管内皮細胞等を、間充織細胞としては、例えば、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞または神経細胞（ニューロン）等をより具体的に例示することができる。

また、細胞接着蛋白質またはペプチド上に形成されるヒト等の人工組織（人工臓器も含む）としては、細胞層とその直下の基底膜を含む組織であればどのようなものでもよいが、例えば、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎系球体組織、人工肝実質組織、人工血管内皮組織等の人工組織や、人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚、人工角膜等の人工臓器を具体的に挙げることができる。

そして、細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品上に目的とする細胞を播種し、培養することにより形成された人工組織は、上記疎水性結合性吸着ポリマーが化学結合でなく疎水性結合で細胞培養基質表面に吸着されていることから、細胞培養基質の種類や材質に関係なく吸着することができ、また、所望時には、細胞培養基質表面から物理的に剥離させることができる。剥離された人工組織は、基底膜の構造を保持したまま移植が可能なることから、その汎用性が一層高く、その適用例として、内径3mm以下の微細人工血管や、体内埋込み型のヒト人工組織等を例示することができ、特に、人工子球体、人工肝臓、人工肺胞など上皮組

織と内皮組織が近接する組織や臓器を好適に例示することができる。

インビトロにおける組織や臓器形成あるいは組織再生を行う際に、力学的支持体である細胞培養基質表面に直接細胞を播種する方法は、細胞培養基質表面を親水加工しても、長期間細胞剥離を起こさないようにするのは難しく、よい結果は期待できない。これに対し、本発明で得られる疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされた細胞培養基質は、その表面にリンカーを介して細胞を播種する方法で、細胞を効率よく、しかも再現性よく固相化でき成績を著しく向上させることができる。この場合、LNやFNを直接塗布する方法もあるが、次第に細胞培養基質表面から剥がれるので、本発明が有効である。例えば、市販の「培養細胞伸展装置」は、周期的に一軸方向に伸展刺激を与え、生体内に近い状態での強制的伸展刺激による細胞の形態変化を観察することができる。本装置に使用されるシリコンウェル（シリコンゴム製の培養皿）として、本発明のポリマーでコーティングされたシリコンウェルを使用した場合、伸展刺激の際に培養基質から細胞が剥離することなく、細胞観察を行うことができる。

また、本発明は、屈曲・変形する材質に、細胞接着活性を有する物質を固相化することができる。例えば、現在では、折り曲げられるプラスチックにプリント配線やIC回路が作製されている。この様な材質に、プリント技術でMMAC、MBAC、MAST等をコーティングし、リンカーとして細胞接着蛋白質またはペプチドを固相化するか、あるいは予め反応性ポリマーと結合させた蛋白質またはペプチドをプラスチックに直接固相化し、細胞を回路図のように配置する際に有用である。

さらに、本発明は、細胞が接着し難い材質（強度の疎水性や滑らかな表面を有するポリマー、無機材、金属等）に、細胞接着活性を有する物質を固相化することができる。例えば、合成ポリマーで作製した人工血

管や人工心肺のホロファイバーは、血小板が吸着して血栓を形成しないように、極力疎水性で凹凸が少なく滑らかな素材で作製されている。この様な素材でも血栓はでき、それが脳や肺の微小血管に詰まる医療問題となっている。ヘパリンをコートして血栓形成を少しでも防止する試みがなされているが、それでも血栓の形成はなかなか止まない。この対策には、合成ポリマーをMMAC、MBAC、MAST等の反応性ポリマーでコーティングし、ヘパリンを固相化する方法や、血管内皮細胞でプラスチック表面を覆う方法が有効であると考えられている。因みに血管内皮細胞には、血栓形成を防止する働きが有る。その際に、ヘパリンの固相化や、細胞接着活性を有するリンカーを固相化し、血管内皮細胞を播種し、プラスチック表面を覆う目的に活用できる。

コラーゲン線維は、細胞接着基質として有用であるが、その接着にはインテグリン受容体が関与する。しかし、細胞層直下に基底膜が存在する上皮細胞、内皮細胞等の接着に際してインテグリンが働くのは、正常時の組織構築モデルでなく、むしろ病態時を想定したモデルなので好ましく無く、インピボで通常働いているシンデカンが働く状態での組織構築が望ましい。この為、コラーゲン線維を基底膜の重要主成分ラミニンでコラーゲン線維表面をコーティングしようとしても、実際はコーティングされ難い。この代わりとして、本発明で示した方法でコラーゲン線維をLN $\alpha$ 鎖G領域の接着ペプチドでコーティングすると、インテグリンに代わってシンデカンが働いている組織構築が可能である。

セルロースは、安価で十分な強度と半透膜性を持ち、色々な形に整形可能で、かつ生体に馴染み易い工業資材である。しかし、細胞接着に必要な官能基を有していないので、人工臓器や細胞培養の基材に用いるには、細胞接着分子をコーティングする必要がある。しかし、その効率とコーティングした物質の残存性は良くない。この為、非接着細胞の懸濁

培養基材に使われるが、接着性細胞の培養基質には不向きだった。今回例示したMMAC、MBAC、MHAC（この順に疎水性が増大する）は、メチレン基が屈曲性に富むのでこの様な素材にも適用でき、かつ側鎖をメトキシ基、ブトキシ基、ヘキシルオキシ基と変えて疎水性を増大させることにより、例えばホロファイバー状に形成したチューブの内腔面や外表面に本発明のコーティングを最適化することができ、その結果細胞接着の基材として使用することが可能になる。

本発明は、細胞培養に通常使用されるポリスチレン以外にも適用可能である。例えば、医療に使われる人工血管、人工水晶体等、埋め込み型プラスチックの表面に細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化処理を施すことにより、患者の細胞が容易に接着できる環境が醸成され、患者の負担軽減が期待できる。

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1（シリコンウエルのコーティング）

20 mm×20 mm×10 mmの溝を有するシリコンウエルに、50  $\mu$ g/mlのMMAC（ISP, International Specialty Products, USA）のエタノール溶液0.5 mlを注ぎ、余分な溶液は吸い取り、その後風乾することにより、MMACでコーティングされたシリコンウエルを得た。

なお、シリコンウエルがMMACでコーティングされているか否かは、例えば、以下の実施例に示すように、シリコンウエルをMMACでコーティングした後、細胞接着蛋白質またはペプチドを固相化し、次いで細胞を播種、培養することにより確認することが出来る。

## 実施例 2 (T2 細胞の静置培養)

実施例1の方法で得たコーティングしたシリコンウェルに、0.1 M トリエタノールアミン緩衝液、pH 8.8 に溶かした  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のフィブロネクチン (FN)、ラミニン-1 (LN) の細胞接着蛋白質溶液、  
5 あるいは  $0.25 \text{ mg}/\text{ml}$  の FIB-1、AG73 の細胞接着ペプチド溶液を各々注ぎ、 $37^\circ\text{C}$  で数時間以上反応させ、これらの細胞接着活性を有する蛋白質あるいはペプチド類を結合し、固相化した (固相化の詳細は後述する実施例 6 参照)。その後、単位面積当たり  $5 \times 10^4/\text{cm}^2$  の肺胞 2 型上皮細胞 (T2 細胞) 懸濁液を注いで、 $\text{CO}_2$  培養装置  
10 内で培養を開始した。

いずれの細胞接着蛋白質またはペプチドを固相化した場合も、T2 細胞は良好に増殖し、細胞密度が増大した (図 1)。このことは、何れの MAC コーティングによる細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化反応  
15 も、細胞毒性を有しないと理解される。

なお、図中の 1 d、2 d および 3 d は、それぞれ培養日数を意味する。

## 実施例 3 (T2 細胞の伸展培養 1)

実施例 2 の方法とほぼ同様にして調製した、細胞接着蛋白質またはペ  
20 プチドを固相化したシリコンウェルに単位面積当たり  $2 \times 10^5/\text{cm}^2$  の T2 細胞を播種し、1 日間静置培養した。播種した細胞が培養面全体を confluent に伸展していることを確認した後、培養細胞伸展装置 ((株) スカラテック社製) を用い、25% 伸展率、毎分 15 回の頻度で水平方向に強制的に細胞伸展を開始し、更に 1 日間培養を継続した。培  
25 養終了後、細胞接着の状態を位相差顕微鏡で撮影した (図 2 の上段 4 列)。

固相化 FN や LN の場合 (FN, 1 d C - 1 d S および LN, 1 d C



ー 1 d S) は、それほど顕著ではないが、固相化した F I B - 1 や A G  
ー 7 3 細胞接着ペプチド上で、強制伸展させながら細胞培養した場合 (F  
I B - 1, 1 d C - 1 d S) および A G 7 3, 1 d C - 1 d S) は、T  
2 細胞が強制伸展方向と垂直方向 (図 2 の写真の縦方向) に自律的に細  
5 長く伸展して、強制伸展の影響を極力減衰させようと配向し直したことが明瞭に観察される。これに比べて、固相化 F N や L N の場合はそれほど明瞭ではないのは、固相化した細胞接着蛋白質と細胞との接着が強制  
伸展力に対抗できる程度には十分強いため、配向し直す必要がなかった  
ためと推測される。

10

#### 実施例 4 (T 2 細胞の伸展培養 2)

実施例 2 の方法とほぼ同様にして調製した、細胞接着蛋白質またはペ  
プチドを固相化したシリコンウェルに単位面積当たり  $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$   
の T 2 細胞を播種し、3 日間静置培養した。T 2 細胞は、図 1 の 3 d  
15 と同様に生育した (結果は、重複するので示さず)。次に、図 1 と同じ強  
制伸展刺激を与え、更に 1 日間培養を継続した。培養終了後、細胞接着  
の状態を位相差顕微鏡で撮影した (図 2 の中段 4 列) (F N, 3 d C - 1  
d S、L N, 3 d C - 1 d S、F I B - 1, 3 d C - 1 d S、および A  
G 7 3, 3 d C - 1 d S)。

20

3 日間の静置培養中に T 2 細胞は、固相化した細胞接着蛋白質または  
ペプチドに強固に接着でき、伸展・増殖したと考えられる。そのため、  
強制的に細胞伸展負荷を 1 日間課した後でも、T 2 細胞は図 2 上段ほど  
明瞭に配向し直すことはなかった。

#### 25 実施例 5 (T 2 細胞の伸展培養 3)

実施例 4 の伸展培養とほぼ同様にして、強制的な伸展培養を 3 日間行

った。培養終了後、細胞接着の状態を位相差顕微鏡で撮影した（図 2 の下段 4 列）（F N, 3 d C - 3 d S、L N, 3 d C - 3 d S、F I B - 1, 3 d C - 3 d S、および A G 7 3, 3 d C - 3 d S）。

3 日間の強制伸展刺激によって、T 2 細胞の形質は、固相化した細胞  
5 接着蛋白質またはペプチドに依存して変化している。特に、生体内では  
T 2 細胞の直下に存在する基底膜構造体の必須成分である L N、および  
その接着ペプチドである A G 7 3 上に細胞を播種した場合には、立方体  
的な 2 型上皮細胞から扁平な 1 型上皮細胞様に変化している。生体内で  
10 るのは、厚みのある 2 型上皮細胞ではなく、扁平な 1 型上皮細胞である。  
3 日間の強制的細胞伸展は、生体内と同様に 2 型上皮細胞を 1 型上皮細胞  
に分化させたことを示唆している。F N は、本来細胞に増殖や移動の  
刺激を与える細胞外基質である。固相化した F N やその細胞接着ペプチ  
ドである F I B - 1 上では、L N や A G 7 3 程 1 型上皮細胞様にならな  
15 かったのは、F N の持つこの性質のためかもしれない。

なお、実施例 3 ～ 5 で行った強制的な細胞伸展培養（伸展率 2 5 %）  
は、前記した培養細胞伸展装置で通常行われている伸展率 1 0 % に比べ、  
かなりの負荷を細胞に与えている。この為、本装置に通常この様な負荷  
20 を掛けると細胞は剥離する。本発明のコーティングしたシリコンウェル  
を使用することにより、剥離することなく、良好に増殖した。

#### 実施例 6（細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品の調製）

全ての操作は無菌操作を前提とする。始めに、細胞接着蛋白質の場  
25 合はエタノールに  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の M M A C や M A S T 等の疎水結合性  
吸着ポリマーを、ペプチドの場合は  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  の M M A C や M A S

Tを溶かし、フィルターを通した後に細胞培養用に表面処理をしていない96穴培養皿に50  $\mu$  lずつ注ぎ、暫く静置後MMAC等を吸い取って風乾する。次に、0.1 M トリエタノールアミン緩衝液、pH 8.8 溶液に10~20  $\mu$  g/mlの細胞接着蛋白質または0.25 mg/mlのペプチドを溶かし、先程MMAC等をコートした96穴培養皿に50  $\mu$  lずつ注ぐ。37℃に加温されたインキュベーター内で加湿しながら、一晚反応させる。反応終了後、反応液を吸い取り、残余の反応液を培地でリンスして、細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品を調製する。該標品は、固相化細胞接着蛋白質またはペプチド基質として、以下の実施例に示すように、細胞培養に供することができる。

なお、細胞接着蛋白質およびペプチドの濃度を、1/5量のそれぞれ2~4  $\mu$  g/mlおよび0.05 mg/mlにしても、通常の細胞培養に支障は無い。

また、MMAC等コートだけのときは、96穴培養皿の底面は、無水マレイン酸が加水分解して出来たカルボキシル基の陰電荷のため、細胞はほとんど接着できない。

実施例7（細胞接着蛋白質に対するT2細胞の接着、および遊離の細胞接着ペプチドによる細胞接着の阻害）

細胞培養の際に、細胞接着蛋白質として通常使用されている市販品のFN、LNおよびVNを各々5  $\mu$  g/ml、10  $\mu$  g/mlおよび10  $\mu$  g/mlの濃度で培養皿に塗布した。Col I（I型コラーゲン）の場合は、1 mM HClに溶かした100  $\mu$  g/mlの濃度のCol Iを培養皿に注ぎ、暫く静置した後、溶液を除いて風乾し、使用前に培地で洗って使用した。次に、上記の細胞外基質を塗布した96穴培養皿上に、無血清のDMEM培地に懸濁した6 x 10<sup>5</sup> 個/mlの肺胞2型上皮細胞

胞 (T2 細胞) を  $100 \mu\text{l}$  ずつ播種し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で、  
37℃、1 日間培養した。培養終了後、メタノール  $100 \mu\text{l}$  で細胞を  
5 分間固定し、0.4% クリスタルバイオレット  $50 \mu\text{l}$  で 30 分間細胞  
5 培養皿に塗布された FN、COL1、LN および VN に接着した細胞数を  
計測した。

他方、種々の LN 分子のアミノ酸配列の中には、細胞接着を誘引する  
配列の存在が知られている。合成した何種類かの細胞接着ペプチドを、  
上記と同様にして調製した細胞培養液に、0.25 mg/ml の濃度で  
10 添加した。以下、上記の方法に準じて細胞数を計測した。その結果を図  
3 に示す。

細胞接着ペプチドの内、特に、AG73、A3G72、hA3G75、  
hA3G83、A4G82、A5G71 および A5G77 ペプチドが、  
T2 細胞の接着を阻害した。これは、これらのペプチドが、細胞に強い  
15 親和性を有し、T2 細胞が、FN、COL1、LN および VN に接着する  
ことを阻害したためと理解される。

なお、FIB-1 ペプチドは、FN への接着を阻害する (通常は、1  
mg/ml 以上必要) ペプチドとして知られているが、FIB-1 ペプ  
チドが阻害作用を発揮しない 0.25 mg/ml という低濃度でも、上  
20 記ペプチドは阻害活性を示している。AG73 の様に、LN ペプチドの  
種類によっては、0.12 mg/ml の濃度でも同じく阻害活性を示し  
た。

実施例 8 (固相化した細胞接着ペプチド基質に対する T2 細胞の接着、  
25 および遊離の当該ペプチドによる細胞接着の阻害)

実施例 6 の方法に準じて調製した細胞接着ペプチドが固相化された培

養皿に、無血清のDME M培地に $6 \times 10^4$ 個/ $100 \mu\text{l}$ の濃度に懸濁したT2細胞を播き、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、24時間培養した。以下、実施例7の方法に準じて、メタノールで固定、染色後、吸光度を測定した。別途、細胞を播種する直前に、固相化に使用されて

5 いる細胞接着ペプチドと同一の遊離ペプチドを細胞懸濁液に添加し、以下、上記と同様に培養後、吸光度を測定した。標準物質としてFNを塗布した場合についても、併せて測定した。結果を図4および図5に示す。

図4は、疎水結合性吸着ポリマーとしてMMACを、図5ではMASTTを、細胞接着ペプチドとして、ラミニン $\alpha$ 鎖GペプチドおよびFIB-1ペプチドを使用し調製した培養皿を用いた結果を示している。図4

10 および図5中、Controlは、固相化細胞接着ペプチドが存在するのみであり、free peptideは、固相化細胞接着ペプチドと同一の遊離ペプチドが、0.25mg/mlで共存している系を示す。

細胞接着ペプチドの固相化に用いる疎水結合性吸着ポリマーの種類

15 によって、一部の細胞接着ペプチドで細胞接着量に変化は有る。しかし、遊離の細胞接着ペプチドによって、MMAC、MAST何れの場合も細胞接着が競争阻害されたことに変わりはない。即ち、細胞は固相化された細胞接着ペプチドを介して接着している。それ故、その細胞接着遊離ペプチドが共存すると固相化した細胞接着ペプチドと遊離の細胞接着ペ

20 プチドが、細胞表面に存在する同一の接着受容体を巡って競合し、その結果として細胞接着が阻害された。このことは、疎水結合性吸着ポリマーを利用して細胞接着ペプチドを固相化させ、それを細胞接着の足場とする方法に、高い普遍性と信頼性があることを示唆している。

AG73T、AG76.8、AG81.2、A2G73、A4G78、

25 A5G73の場合は、一見細胞接着遊離ペプチドによる競争阻害が掛からなく、非特異的接着のように見える。しかし、これは、細胞の接着受

容体と細胞接着遊離ペプチドとの結合が、接着受容体と細胞接着固相化ペプチドとの結合に比して弱いために、阻害が掛からなかった為である。因みに、この場合でも、ヘパリン処理による接着阻害が掛かる（実施例 10 および図 7 参照）ことから、細胞接着ペプチドと細胞表面の接着受  
5 容体であるヘパラン硫酸プロテオグリカンに属するシンデカンを介した特異的接着であると考えられる。

実施例 9（固相化した細胞接着ペプチド基質に対する T 2 細胞の細胞接着・伸展の時間経過／人工組織の調製）

10 培養皿に固相化された細胞接着ペプチドおよび T 2 細胞を用い、実施例 8 の方法に準じて、1～24 時間培養した。培養後の細胞接着と伸展の様子を微分干渉（光学）顕微鏡で観察した。培養 1、6 および 24 時間後の結果を図 6 に示す。

図 6 では、T 2 細胞を播種した細胞培養基質上で、1 時間（A～C）、  
15 6 時間（D～L）、および 24 時間（M～O）培養後の微分干渉顕微鏡写真を示している。

細胞接着ペプチドとして、B、E および M は A G 7 3 を、C、L および O は F I B - 1 を、F は A 3 G 7 2 を、G および N は A 4 G 8 2 を、H は A 5 G 7 1 を、I は A 5 G 7 7 を、J は h A 3 G 7 5 を、K は h A  
20 3 G 8 3 を、また、A および D は標準物質として F N を使用した。

F N より若干劣るが、細胞接着ペプチド上でも 1 時間で細胞は接着し、一部の細胞では伸展を開始している。6 時間の培養では、F N と比べて遜色なく、A G 7 3、A 3 G 7 2 および A 4 G 8 2 ペプチド上で伸展している。h A 3 G 7 5 および h A 3 G 8 3 ペプチド上では、伸展は遅れ  
25 ているが十分接着している。24 時間では、A G 7 3、A 4 G 8 2 および F I B - 1 共に、F N 上に播種した場合と同様（図には示していない）

に、殆どの細胞が伸展を完了している。

実施例 10（固相化した細胞接着ペプチド基質に対するヘパリン処理による T2 細胞の接着阻害）

- 5 実施例 6 の方法に準じて調製した細胞接着ペプチドが固相化した培養皿に 100  $\mu$ g/ml のヘパリン溶液を注ぎ、2 時間インキュベートした。ヘパリンが固相化した細胞接着ペプチドに結合した後ヘパリン溶液を除き、T2 細胞懸濁液を培養皿に播種した。24 時間培養した後の接着細胞数についての結果を図 7 に示す。
- 10 原理的には、細胞接着ペプチドが先にヘパリンと結合して覆われると、細胞表面に存在するヘパリン様糖鎖（ヘパラン硫酸）を有する細胞接着受容体、即ちヘパラン硫酸プロテオグリカンに属する蛋白質であるシンデカンが、そのヘパラン硫酸糖鎖部分を使って細胞接着ペプチドと結合出来なくなるために、細胞接着が阻害されることを示している。
- 15 固相化した LN $\alpha$  鎖 G 領域由来細胞接着ペプチドの場合は、ほとんどの細胞接着が阻害された。このことは、固相化ペプチドとヘパリンとが親和性を以って結合したため、細胞表面に局在するヘパリンと類似の糖鎖構造を有するシンデカンと細胞接着ペプチドとの本来の結合が競合阻害されたと理解される。
- 20 このことから、AG73、AG73T、AG76.8、AG81.2、A2G73、A3G72、A4G78、A4G82、A5G73、A5G77、hA3G75、hA3G83 の結合相手は、細胞表面のシンデカンであると考えられる。また、FIB-1 ペプチドの場合は阻害が掛からない。FN との結合に関与する細胞接着受容体はインテグリン  $\alpha$ 5
- 25  $\beta$ 1 であり、その結合部位が RGD アミノ酸配列であることは確立された事実である。この配列を含む FIB-1 ペプチドに対してもインテグ

リンが関与するので、ヘパリンによる阻害が掛からないのは当然の結果である。このこともまた、本実施例の信頼性を示唆している。

実施例 1 1（固相化した細胞接着ペプチド基質とは異なる遊離の細胞接着ペプチドによる T 2 細胞の接着阻害）

実施例 7 の方法に準じて、固相化した細胞接着ペプチド上で T 2 細胞を培養する際に、固相化ペプチドとは異なる遊離ペプチドを添加した結果を図 8 に示す。

固相化したペプチドを同じペプチドを培養液に遊離の状態に添加すると、両者は T 2 細胞のシンデカンを巡って競争し、その結果細胞接着が阻害される（実施例 7 参照）。現在、シンデカンには遺伝的に 4 種類の存在が知られている。ここでは、それぞれのペプチドに対するシンデカンが、互いに共有（融通）し合っている（common）のか、有る程度の範囲で重複しているだけか、それとも互いに排他的なのかを検討した。

例えば、AG 7 3 を固相化した場合、遊離状態の AG 7 3 以外にも、A 3 G 7 2、A 4 G 8 2、A 5 G 7 1、A 5 G 7 7、h A 3 G 7 5、h A 3 G 8 3 が細胞接着を阻害していることから、互いにリセプターを共有し合っていることを示唆している。しかし、AG 8 1. 2、AG 7 3 T は阻害できない。

また、AG 8 1. 2 や AG 7 3 T を固相化した場合は、遊離の AG 8 1. 2 や AG 7 3 T は自分自身の固相化ペプチドと競争阻害できないか、できては極わずかである。しかし、上記の LN ペプチドによって、細胞接着が阻害されている。

この結果は、お互いのペプチドはリセプターを共有（融通）し合っていることを示している。しかし、その共有（融通）は対等ではなく、ペプチド間で受容体との親和性に順位が存在することを伺わせる。即ち、



AG73、A3G72、A4G82、A5G71、A5G77、hA3G75、hA3G83 > AG81. 2、AG73T。なお、AG73Tは、AG73のアミノ酸配列を入れ替えて作った人工の配列で、天然には存在しない。

5 FIB-1 のリセプターは、シンデカンではなく、インテグリンと呼ばれる細胞接着分子である。そのインテグリンとFIB-1との結合が、AG73等のLNペプチドで阻害されるが、その逆は無い。即ち、FIB-1を固相化した場合は、遊離のLNペプチドで阻害が掛かるが、AG73等を固相化した場合は、遊離のFIB-1で阻害が全く掛からない。  
10 い。このことは、細胞接着においてインテグリンを介する細胞接着よりもシンデカンを介した細胞接着が優先されることを示している。この点でも、LN $\alpha$ 鎖G領域の細胞接着ペプチドを固相化して細胞接着基質とすることの利点が明瞭である。

15 実施例12（固相化したFIB-1ペプチドに対するT2細胞の接着結合力（親和性、affinity）を基準にした固相化したLNの細胞接着ペプチドの結合力）

図8において、遊離のFIB-1ペプチドは、T2細胞が固相化FIB-1ペプチドに細胞接着するのを競争阻害しただけでなく、AG73  
20 TおよびAG81. 2ペプチドに接着するのも阻害した。反対に、遊離のAG73TおよびAG81. 2ペプチドは、固相化FIB-1に対する細胞接着を阻害できなかったため、T2細胞に対するAG73TおよびAG81. 2ペプチドの結合力（affinity）は、FIB-1の結合力より低い（実施例12および表1参照、クラスCに分類）。

25 他方、固相化FIB-1ペプチドに対する細胞接着を、遊離のAG73およびA4G82ペプチドは阻害できたが、逆の固相化AG73およ

びA 4 G 8 2 ペプチドに対する細胞接着を、遊離のF I B - 1 ペプチドは阻害できなかった。従って、T 2 細胞に対するA G 7 3 およびA 4 G 8 2 ペプチドの結合力 (affinity) は、F I B - 1 の結合力より高い (表 1 参照、クラスA A およびA に分類) ことは明白であるが、どの程度高いのか不明である。

図 8 は、固相化した細胞接着ペプチドが、F I B - 1 およびA G 7 3 の 2 種類混在する場合、T 2 細胞がF I B - 1 ペプチドを介して接着しているならば遊離のF I B - 1 ペプチドで接着阻害できるが、A G 7 3 ペプチドを介して接着しているならば遊離のF I B - 1 ペプチドでは接着阻害できないことを示唆している。そこで、F I B - 1 ペプチド量を 0.25 mg / ml に定め、A G 7 3 ペプチド量をF I B - 1 の 1 / 1, 250 量 = 0.20  $\mu$ g / ml から 1 / 2 量 = 0.125 mg / ml まで両者の濃度比を変えて混合し、疎水性吸着ポリマーMMACを塗布した培養皿に固相化させた。この固相化ペプチド上でT 2 細胞を、無血清で 1 日間培養した場合の細胞接着量を、固相化F I B - 1 上で培養した場合を 100 % として図 9 に示す。

F I B - 1 : A G 7 3 = 1 : 0.004 の場合は、依然固相化F I B - 1 ペプチドを介してT 2 細胞は接着するので、遊離のF I B - 1 ペプチドはF I B - 1 のみが固相化された場合と同程度にT 2 細胞の接着を阻害した。しかし、F I B - 1 : A G 7 3 = 1 : 0.02 に増加させた場合、既にT 2 細胞は固相化A G 7 3 ペプチドを介して細胞接着するように遷移 (transition) するので、遊離のF I B - 1 ペプチドでは最早細胞接着を阻害できなかった。遷移中間点の混合比 = 0.01 であるので、その逆数 100 は、A G 7 3 対F I B - 1 のT 2 細胞に対する結合力の比を示している。同様に、A 3 G 7 2 およびA 4 G 8 2 ペプチドでは、遷移中間点の混合比 = 0.1 であるので、T 2 細胞に対する結合力

は F I B - 1 の 1 0 倍に相当する。この結果を踏まえ、A G 7 3、A 3 G 7 2、A 4 G 8 2 ペプチドの T 2 細胞に対する結合力をそれぞれクラス A A、A に分類した（表 1 参照）。

図 8 において、遊離の A 5 G 7 1、A 5 G 7 7、h A 3 G 7 5、h A 3 G 8 2 ペプチドは、固相化 F I B - 1 ペプチドへの細胞接着を阻害できるが、図 9 において遷移中間点の混合比は約 1 であるので、T 2 細胞に対する結合力を B に分類した（表 1 参照）。

図 8 および 9 で行った方法は、細胞接着ペプチドの結合力（親和性、affinity）に相対的な序列を与え、細胞接着の強さを定量的に考察できる簡便な方法として大変有効である。

表 1 には、F N 分子の中でインテグリンと結合する部位 R G D アミノ酸配列を含む F I B - 1 ペプチドと T 2 細胞の親和性（結合・接着力）を基準に、ラミニン  $\alpha$  鎖 G 領域ペプチドを、非常に強く結合・接着する A A クラス、強く接着する A クラス、F I B - 1 と同程度に接着する B クラス、およびそれ以下の弱く結合する C クラスに分類した結果を示す。

(表 1)

ラミニン $\alpha$ 鎖 Gペプチド	アミノ酸配列	細胞接着の阻害程度		T2細胞に対する結合力	
		遊離ペプチド	ヘパリン	対 FIB-1 比	総合評価
AG73	RKRLQVQLSIRT	+++	+++	100	AA
AG73T	LQRRSVLRTKI	No	+		C
AG76.8	TLQLQEGRLHFM	No	+		C
AG81.2	VKTEYIKRKAFM	No	++	< 1	C
A2G72	KNRLTIELEVRT	No	++		C
A3G72	KPRLQFSLDIQT	+++	+++	10	A
A4G78	GEKSQFSIRLKT	No	+++		C
A4G82	TLFLAHGRLVFM	+++	+++	10	A
A5G71	GPLPSYLQFVGI	+++	No	< 1	B
A5G73	RNRLHLSMLVRP	+	++		C
A5G77	LVLFLNHGHFVA	+++	+		B
hA3G75	KNSFMALYLSKG	+++	+	2	B
hA3G83	GNSTISIRAPVY	+++	+	1-2	B
FIB-1	YAVTGRGDSPAS	++	No	(1)	B

AA:非常に強く結合・接着する; A:強く結合・接着する  
 B : 中程度に結合・接着する (FIB-1ペプチドと同程度)  
 C : FIB-1ペプチドに比して弱く結合・接着する

### 実施例 1 3 (偽似マトリックスの調製)

疎水結合性吸着ポリマー、MBAC、MASTまたはMMACの各々  
 5 200mgを水に分散させ、1N NaOH溶液を少量ずつ添加し、完全  
 に溶解させた。これに、WSC (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino  
 propyl)carbodiimide, hydrochloride) 50mgを加えて2時間反応させ  
 た後、ペプチド20mgを加えて、室温で2時間攪拌反応させた。反応  
 終了後、水に透析してアルカリと低分子を除き、反応生成物を凍結乾燥  
 10 して目的の偽似マトリックスを調製した。

### 実施例 1 4 (固相化した偽似マトリックスに対するT2細胞の接着、および遊離の当該ペプチドによる細胞接着の競争阻害-1)

実施例 1 3 で調製した各々の細胞接着ペプチド類を結合させた偽似

マトリックス (M B A C - p e p t i d e) を、D M E M 培地で 1 ~ 10  $\mu$  g / m l の濃度に希釈し、96 穴培養皿に各 100  $\mu$  l 注ぎ、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩静置して、培養皿に吸着・固相化させた。未吸着の M B A C - p e p t i d e は、D M E M 培地で十分洗って除いた。次に、無血清の D M E M に、6 x 10<sup>5</sup> 個 / m l の濃度で懸濁した T 2 細胞を、各 100  $\mu$  l 播種した。無血清で 1 日培養した後、メタノール 100  $\mu$  l で 5 分間固定し、0.4 % クリスタルバイオレット 50  $\mu$  l で 30 分間 T 2 細胞を染色した。過剰な染色は水洗し、細胞質の吸光度 (A 595) から、接着した細胞数を計測した。その結果を図 10 に示す。

1  $\mu$  g / m l の M B A C - A G 7 3 を除き、測定した全ての範囲内で、M B A C - A G 7 3、- A 3 G 7 2、- A 4 G 8 2 X、- F I B - 1 は、F N (フィブロネクチン) を直接塗布した場合と同等の細胞接着能を発揮した。また、遊離の当該細胞接着ペプチドで細胞接着が競争阻害されることから、T 2 細胞の接着は、M B A C に結合した細胞接着ペプチドを介した特異的結合によると考えられる。なお、M B A C - A 4 G 8 2 X に対する T 2 細胞の接着が遊離の A 4 G 8 2 ペプチドで阻害されたことは、C 末端の M e t 残基を N l e 残基に代えても、細胞接着に関しては同等に機能することを示唆している。

実施例 15 (固相化した偽似マトリックスに対する T 2 細胞の接着、および遊離の当該ペプチドによる細胞接着の競争阻害 - 2)

実施例 13 で調製した各々の細胞接着ペプチド類を結合させた偽似マトリックス (M A S T - p e p t i d e) を、実施例 14 と同様に 96 穴培養皿に吸着・固相化させ、T 2 細胞を播種・培養した。その結果を図 11 に示す。

1 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の測定した範囲全てにおいて、MAST-A G 7  
3、-A 3 G 7 2、-A 4 G 8 2 X、-F I B - 1 は、FNを直接塗布  
した場合と同等の細胞接着能を発揮した。また、遊離の当該細胞接着ペ  
プチドで細胞接着が競争阻害されるが、その程度はMBAC-pept  
5 i d e の場合より低かった。これは、T 2 細胞とMAST-pept i  
d e の特異的結合が、T 2 細胞とMBAC-pept i d e との結合よ  
り、一層強いことによると考えられる。なお、MAST-A 4 G 8 2 X  
に対するT 2 細胞の接着が遊離のA 4 G 8 2 ペプチドで阻害されたこと  
は、C末端のM e t 残基をN l e 残基に代えても、細胞接着に関しては  
10 同等に機能することを示唆している。

また、培養皿に吸着・固相化したp o l y m e r - p e p t i d e (偽  
似マトリックス) を、DMEMで2 ~ 4 日間洗っても細胞接着量はほと  
んど影響を受けない。このことは、培養皿と偽似マトリックスとの結合  
は、十分強く安定していることを示している。

15

実施例 1 6 (固相化した偽似マトリックスに対する当該ペプチドのポリ  
クローナル抗体処理によるT 2 細胞の接着阻害)

実施例 1 3 で調製した各々の細胞接着ペプチド類を結合させた偽似  
マトリックス (MBAC-pept i d e) を、DMEM培地で1 ~ 1  
20 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に希釈し、9 6 穴培養皿に各1 0 0  $\mu\text{l}$  注ぎ、CO  
<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩静置して、培養皿に吸着・固相化させた。  
未吸着のMBAC-pept i d e は、DMEM培地で十分洗って除い  
た。次に、無血清のDMEMで4 ~ 1 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈した抗体1 0  
0  $\mu\text{l}$  を培養皿に注ぎ、2 ~ 4 時間インキュベートして、ペプチドに抗  
25 体を結合させた。対照群には、正常のI g Gを用いた。処理後抗体を除  
き、6 x 1 0 <sup>5</sup> 個/ $\text{ml}$  の濃度で懸濁したT 2 細胞を、各1 0 0  $\mu\text{l}$  播

種した。無血清で1日培養した後、メタノール $100\mu\text{l}$ で5分間固定し、 $0.4\%$ クリスタルバイオレット $50\mu\text{l}$ で30分間T2細胞を染色した。過剰な染色は水洗し、細胞質の吸光度( $A_{595}$ )から、接着した細胞数を計測した。結果を図12に示す。

- 5 測定した全ての範囲内で、MBAC-AG73T、-AG81.2X、-FIB-1は、FNを塗布した場合とほぼ同程度の細胞接着能を発揮した。また、ペプチドに対する抗体処理で、細胞接着が特異的に阻害されたことから、T2細胞はペプチドを介して接着していると考えられる。

- 10 なお、MBACの代わりにMASTを用いて作製したMAST-peptideについても、同様の結果を得た。その一例としてMAST-FIB-1の結果も図12に示す。 $2.5-10\mu\text{g/ml}$ でMAST-FIB-1を固相化した場合、抗体の阻害程度が低いのは、実施例15の場合と同様に、細胞に対する親和性がMBAC-FIB-1より遙かに強いためであるが、 $1\mu\text{g/ml}$ にすると固相化MBAC-FIB-1とMAST-FIB-1は、抗FIB-1抗体処理によって同程度に阻害された。

実施例17（固相化した偽似マトリックスに対するヘパリン処理によるT2細胞の接着阻害）

- 20 実施例13で調製した各々の細胞接着ペプチド類を結合させた偽似マトリックス(MBAC-peptide)を、DMEM培地で $1-10\mu\text{g/ml}$ の濃度に希釈し、96穴培養皿に各 $100\mu\text{l}$ 注ぎ、 $\text{CO}_2$ インキュベーター内で一晩静置して、培養皿に吸着・固相化させた。未吸着のMBAC-peptideは、DMEM培地で十分洗って除いた。次に、 $1\text{mg/ml}$ のヘパリンを溶かしたDMEM $100\mu\text{l}$ を培養皿に注ぎ、2時間インキュベートして、ペプチドにヘパリンを結合さ
- 25

せた。対照群は、DME Mのみで処理した。処理後ヘパリンを除き、 $6 \times 10^5$ 個/mlの濃度で懸濁したT2細胞を、各100  $\mu$ l播種した。無血清で1日培養した後、メタノール100  $\mu$ lで5分間固定し、0.4%クリスタルバイオレット50  $\mu$ lで30分間T2細胞を染色した。

5 過剰な染色は水洗し、細胞質の吸光度(A595)から、接着した細胞数を計測した。結果を図13および図14に示す。

細胞接着ペプチドに対するヘパリン処理で、細胞接着が対照群より図13では25~40%、図14では35~55%特異的に阻害されたことから、T2細胞は細胞表面に存在するヘパリン類似の糖鎖を有する接着受容体、シンデカンを介して固相化したペプチド、図13のAG73、A3G72、A4G82X、および図14のAG73T、AG76.8X、AG81.2X、A4G78、A5G73Xに接着していると考えられる。なお、ヘパリンによる接着阻害の程度が図14と比して図13で低いのは、細胞と固相化した細胞接着ペプチドとの親和性が、AG73、A3G72、A4G82Xの場合に一層高いためである(実施例12、図9および表1参照)。また、図14の一部のMBAC-peptideでは、1~2.5  $\mu$ g/mlで塗布すると、細胞接着量が低下し、ヘパリンによる阻害の程度も低下している。これは、MBAC-peptideの固相化量が低下し、そのため細胞接着に占める非特異的接着が増加した為と推測される。

10  
15  
20

偽似マトリックスPolymer-A4G82X(図13)、-AG76.8X、-AG81.2X、-A5G73X(図14)の作製には、Metの代わりに実際の蛋白質には存在しないNleを用いているが、それぞれA4G82、AG76.8、AG81.2、A5G83を固相化した場合(実施例8、図4および5参照)と同等の細胞接着能を発揮している。しかも、ヘパリンで同様に接着阻害される(実施例10および

25



び図 7 参照) ことから、T 2 細胞はM e t とN l e を区別しないで認識したと考えられる。M e t は側鎖のS 原子が酸化されてスルフォキシドやスルホンになると生物活性を失うことがよくある。本偽似マトリックスの場合も同様に失活が危惧されたが、M e t をN l e で置き換えた  
5 ペプチドが本来のペプチドと同等の性能を発揮したことは、偽似マトリックスの一層の安定性を確保し、その用途を広げる上で有効である。

実施例 1 8 (エタノールを含む水溶液に溶解した偽似マトリックスの塗布、および塗布した偽似マトリックスに対するT 2 細胞の接着)

10 5 0 % エタノールに溶解した  $2 - 20 \mu\text{g}/\text{ml}$  の M A S T - G R G D S P (G l y - A r g - G l y - A s p - S e r - P r o) および M M A C - G R G D S P を培養皿に  $50 \mu\text{l}$  注ぎ、風乾・固相化させた。次に、M A S T - G R G D S P および M M A C - G R G D S P (0. 1 - 1. 0  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) を塗布した培養皿を無血清の D M E M 培地で  
15 リンスし、同培地に  $6 \times 10^4$  個 /  $100 \mu\text{l}$  の濃度に懸濁した T 2 細胞を播き、C O<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 7 °C、2 4 時間培養した。以下、実施例 7 の方法に準じて、メタノールで固定、染色後、吸光度を測定した。結果を図 1 5 に示す。標準物質として F N を塗布した培養も同時に行い、F N への細胞接着を基準 (1 0 0 %) として示した。

20 通常の蛋白質ならば、5 0 % エタノールという条件において変性、失活する。しかし、M A S T / M M A C - G R G D S P のみならず、実施例 2 1 および 2 2 に示したように、偽似マトリックスは 5 0 % エタノールに溶かしても安定した細胞接着能を発揮した (実施例 2 1, 2 2 および図 1 8、1 9 参照)。この性能は、塗布した培養皿を室温で長期間放置  
25 した後も失われなかった。

両偽似マトリックスへの T 2 細胞の接着は、標準の細胞接着蛋白質 F

Nより若干低い。GRGDSPペプチドの場合、疎水性吸着ポリマーとの距離を確保し立体障害を解消するスペーサーの役割を果たすアミノ酸残基は、 $-CO \cdot NH-Gly-$ のみの1残基であるが、GRGDSP配列を含みスペーサーとなるアミノ酸残基が $-CO \cdot NH-Tyr-Ala-Val-Thr-Gly-$ の5残基であるFIB-1ペプチドの場合は、FNと同等の細胞接着能を発揮した（実施例21、22および図18、19参照）。従って、MAST/MMAC-GRGDSPの場合にT2細胞接着量が若干低いのは、GRGDSPペプチドに対する疎水性吸着ポリマーによる立体障害が原因の少なくとも一つと考えられる。

10    5    10    15    20    25    30    35    40    45    50    55    60    65    70    75    80    85    90    95    100    105    110    115    120    125    130    135    140    145    150    155    160    165    170    175    180    185    190    195    200    205    210    215    220    225    230    235    240    245    250    255    260    265    270    275    280    285    290    295    300    305    310    315    320    325    330    335    340    345    350    355    360    365    370    375    380    385    390    395    400    405    410    415    420    425    430    435    440    445    450    455    460    465    470    475    480    485    490    495    500    505    510    515    520    525    530    535    540    545    550    555    560    565    570    575    580    585    590    595    600    605    610    615    620    625    630    635    640    645    650    655    660    665    670    675    680    685    690    695    700    705    710    715    720    725    730    735    740    745    750    755    760    765    770    775    780    785    790    795    800    805    810    815    820    825    830    835    840    845    850    855    860    865    870    875    880    885    890    895    900    905    910    915    920    925    930    935    940    945    950    955    960    965    970    975    980    985    990    995    1000    1005    1010    1015    1020    1025    1030    1035    1040    1045    1050    1055    1060    1065    1070    1075    1080    1085    1090    1095    1100    1105    1110    1115    1120    1125    1130    1135    1140    1145    1150    1155    1160    1165    1170    1175    1180    1185    1190    1195    1200    1205    1210    1215    1220    1225    1230    1235    1240    1245    1250    1255    1260    1265    1270    1275    1280    1285    1290    1295    1300    1305    1310    1315    1320    1325    1330    1335    1340    1345    1350    1355    1360    1365    1370    1375    1380    1385    1390    1395    1400    1405    1410    1415    1420    1425    1430    1435    1440    1445    1450    1455    1460    1465    1470    1475    1480    1485    1490    1495    1500    1505    1510    1515    1520    1525    1530    1535    1540    1545    1550    1555    1560    1565    1570    1575    1580    1585    1590    1595    1600    1605    1610    1615    1620    1625    1630    1635    1640    1645    1650    1655    1660    1665    1670    1675    1680    1685    1690    1695    1700    1705    1710    1715    1720    1725    1730    1735    1740    1745    1750    1755    1760    1765    1770    1775    1780    1785    1790    1795    1800    1805    1810    1815    1820    1825    1830    1835    1840    1845    1850    1855    1860    1865    1870    1875    1880    1885    1890    1895    1900    1905    1910    1915    1920    1925    1930    1935    1940    1945    1950    1955    1960    1965    1970    1975    1980    1985    1990    1995    2000    2005    2010    2015    2020    2025    2030    2035    2040    2045    2050    2055    2060    2065    2070    2075    2080    2085    2090    2095    2100    2105    2110    2115    2120    2125    2130    2135    2140    2145    2150    2155    2160    2165    2170    2175    2180    2185    2190    2195    2200    2205    2210    2215    2220    2225    2230    2235    2240    2245    2250    2255    2260    2265    2270    2275    2280    2285    2290    2295    2300    2305    2310    2315    2320    2325    2330    2335    2340    2345    2350    2355    2360    2365    2370    2375    2380    2385    2390    2395    2400    2405    2410    2415    2420    2425    2430    2435    2440    2445    2450    2455    2460    2465    2470    2475    2480    2485    2490    2495    2500    2505    2510    2515    2520    2525    2530    2535    2540    2545    2550    2555    2560    2565    2570    2575    2580    2585    2590    2595    2600    2605    2610    2615    2620    2625    2630    2635    2640    2645    2650    2655    2660    2665    2670    2675    2680    2685    2690    2695    2700    2705    2710    2715    2720    2725    2730    2735    2740    2745    2750    2755    2760    2765    2770    2775    2780    2785    2790    2795    2800    2805    2810    2815    2820    2825    2830    2835    2840    2845    2850    2855    2860    2865    2870    2875    2880    2885    2890    2895    2900    2905    2910    2915    2920    2925    2930    2935    2940    2945    2950    2955    2960    2965    2970    2975    2980    2985    2990    2995    3000    3005    3010    3015    3020    3025    3030    3035    3040    3045    3050    3055    3060    3065    3070    3075    3080    3085    3090    3095    3100    3105    3110    3115    3120    3125    3130    3135    3140    3145    3150    3155    3160    3165    3170    3175    3180    3185    3190    3195    3200    3205    3210    3215    3220    3225    3230    3235    3240    3245    3250    3255    3260    3265    3270    3275    3280    3285    3290    3295    3300    3305    3310    3315    3320    3325    3330    3335    3340    3345    3350    3355    3360    3365    3370    3375    3380    3385    3390    3395    3400    3405    3410    3415    3420    3425    3430    3435    3440    3445    3450    3455    3460    3465    3470    3475    3480    3485    3490    3495    3500    3505    3510    3515    3520    3525    3530    3535    3540    3545    3550    3555    3560    3565    3570    3575    3580    3585    3590    3595    3600    3605    3610    3615    3620    3625    3630    3635    3640    3645    3650    3655    3660    3665    3670    3675    3680    3685    3690    3695    3700    3705    3710    3715    3720    3725    3730    3735    3740    3745    3750    3755    3760    3765    3770    3775    3780    3785    3790    3795    3800    3805    3810    3815    3820    3825    3830    3835    3840    3845    3850    3855    3860    3865    3870    3875    3880    3885    3890    3895    3900    3905    3910    3915    3920    3925    3930    3935    3940    3945    3950    3955    3960    3965    3970    3975    3980    3985    3990    3995    4000    4005    4010    4015    4020    4025    4030    4035    4040    4045    4050    4055    4060    4065    4070    4075    4080    4085    4090    4095    4100    4105    4110    4115    4120    4125    4130    4135    4140    4145    4150    4155    4160    4165    4170    4175    4180    4185    4190    4195    4200    4205    4210    4215    4220    4225    4230    4235    4240    4245    4250    4255    4260    4265    4270    4275    4280    4285    4290    4295    4300    4305    4310    4315    4320    4325    4330    4335    4340    4345    4350    4355    4360    4365    4370    4375    4380    4385    4390    4395    4400    4405    4410    4415    4420    4425    4430    4435    4440    4445    4450    4455    4460    4465    4470    4475    4480    4485    4490    4495    4500    4505    4510    4515    4520    4525    4530    4535    4540    4545    4550    4555    4560    4565    4570    4575    4580    4585    4590    4595    4600    4605    4610    4615    4620    4625    4630    4635    4640    4645    4650    4655    4660    4665    4670    4675    4680    4685    4690    4695    4700    4705    4710    4715    4720    4725    4730    4735    4740    4745    4750    4755    4760    4765    4770    4775    4780    4785    4790    4795    4800    4805    4810    4815    4820    4825    4830    4835    4840    4845    4850    4855    4860    4865    4870    4875    4880    4885    4890    4895    4900    4905    4910    4915    4920    4925    4930    4935    4940    4945    4950    4955    4960    4965    4970    4975    4980    4985    4990    4995    5000    5005    5010    5015    5020    5025    5030    5035    5040    5045    5050    5055    5060    5065    5070    5075    5080    5085    5090    5095    5100    5105    5110    5115    5120    5125    5130    5135    5140    5145    5150    5155    5160    5165    5170    5175    5180    5185    5190    5195    5200    5205    5210    5215    5220    5225    5230    5235    5240    5245    5250    5255    5260    5265    5270    5275    5280    5285    5290    5295    5300    5305    5310    5315    5320    5325    5330    5335    5340    5345    5350    5355    5360    5365    5370    5375    5380    5385    5390    5395    5400    5405    5410    5415    5420    5425    5430    5435    5440    5445    5450    5455    5460    5465    5470    5475    5480    5485    5490    5495    5500    5505    5510    5515    5520    5525    5530    5535    5540    5545    5550    5555    5560    5565    5570    5575    5580    5585    5590    5595    5600    5605    5610    5615    5620    5625    5630    5635    5640    5645    5650    5655    5660    5665    5670    5675    5680    5685    5690    5695    5700    5705    5710    5715    5720    5725    5730    5735    5740    5745    5750    5755    5760    5765    5770    5775    5780    5785    5790    5795    5800    5805    5810    5815    5820    5825    5830    5835    5840    5845    5850    5855    5860    5865    5870    5875    5880    5885    5890    5895    5900    5905    5910    5915    5920    5925    5930    5935    5940    5945    5950    5955    5960    5965    5970    5975    5980    5985    5990    5995    6000    6005    6010    6015    6020    6025    6030    6035    6040    6045    6050    6055    6060    6065    6070    6075    6080    6085    6090    6095    6100    6105    6110    6115    6120    6125    6130    6135    6140    6145    6150    6155    6160    6165    6170    6175    6180    6185    6190    6195    6200    6205    6210    6215    6220    6225    6230    6235    6240    6245    6250    6255    6260    6265    6270    6275    6280    6285    6290    6295    6300    6305    6310    6315    6320    6325    6330    6335    6340    6345    6350    6355    6360    6365    6370    6375    6380    6385    6390    6395    6400    6405    6410    6415    6420    6425    6430    6435    6440    6445    6450    6455    6460    6465    6470    6475    6480    6485    6490    6495    6500    6505    6510    6515    6520    6525    6530    6535    6540    6545    6550    6555    6560    6565    6570    6575    6580    6585    6590    6595    6600    6605    6610    6615    6620    6625    6630    6635    6640    6645    6650    6655    6660    6665    6670    6675    6680    6685    6690    6695    6700    6705    6710    6715    6720    6725    6730    6735    6740    6745    6750    6755    6760    6765    6770    6775    6780    6785    6790    6795    6800    6805    6810    6815    6820    6825    6830    6835    6840    6845    6850    6855    6860    6865    6870    6875    6880    6885    6890    6895    6900    6905    6910    6915    6920    6925    6930    6935    6940    6945    6950    6955    6960    6965    6970    6975    6980    6985    6990    6995    7000    7005    7010    7015    7020    7025    7030    7035    7040    7045    7050    7055    7060    7065    7070    7075    7080    7085    7090    7095    7100    7105    7110    7115    7120    7125    7130    7135    7140    7145    7150    7155    7160    7165    7170    7175    7180    7185    7190    7195    7200    7205    7210    7215    7220    7225    7230    7235    7240    7245    7250    7255    7260    7265    7270    7275    7280    7285    7290    7295    7300    7305    7310    7315    7320    7325    7330    7335    7340    7345    7350    7355    7360    7365    7370    7375    7380    7385    7390    7395    7400    7405    7410    7415    7420    7425    7430    7435    7440    7445    7450    7455    7460    7465    7470    7475    7480    7485    7490    7495    7500    7505    7510    7515    7520    7525    7530    7535    7540    7545    7550    7555    7560    7565    7570    7575    7580    7585    7590    7595    7600    7605    7610    7615    7620    7625    7630    7635    7640    7645    7650    7655    7660    7665    7670    7675    7680    7685    7690    7695    7700    7705    7710    7715    7720    7725    7730    7735    7740    7745    7750    7755    7760    7765    7770    7775    7780    7785    7790    7795    7800    7805    7810    7815    7820    7825    7830    7835    7840    7845    7850    7855    7860    7865    7870    7875    7880    7885    7890    7895    7900    7905    7910    7915    7920    7925    7930    7935    7940    7945    7950    7955    7960    7965    7970    7975    7980    7985    7990    7995    8000    8005    8010    8015    8020    8025    8030    8035    8040    8045    8050    8055    8060    8065    8070    8075    8080    8085    8090    8095    8100    8105    8110    8115    8120    8125    8130    8135    8140    8145    8150    8155    8160    8165    8170    8175    8180    8185    8190    8195    8200    8205    8210    8215    8220    8225    8230    8235    8240    8245    8250    8255    8260    8265    8270    8275    8280    8285    8290    8295    8300    8305    8310    8315    8320    8325    8330    8335    8340    8345    8350    8355    8360    8365    8370    8375    8380    8385    8390    8395    8400    8405    8410    8415    8420    8425    8430    8435    8440    8445    8450    8455    8460    8465    8470    8475    8480    8485    8490    8495    8500    8505    8510    8515    8520    8525    8530    8535    8540    8545    8550    8555    8560    8565    8570    8575    8580    8585    8590    8595    8600    8605    8610    8615    8620    8625    8630    8635    8640    8645    8650    8655    8660    8665    8670    8675    8680    8685    8690    8695    8700    8705    8710    8715    8720    8725    8730    8735    8740    8745    8750    8755    8760    876

し、遊離GRGDS Pペプチドによる競争阻害は一層有効に働いた。

実施例20（エタノールを含む水溶液に溶解したMMAC-GRGDS P偽似マトリックスを風乾・固相化した培養皿へのT2細胞の接着、および遊離のGRGDS Pペプチドによる競争阻害の濃度依存性）

実施例18と同様に、50%エタノールにMMAC-GRGDS Pを溶解し、培養皿に風乾・固相化後、T2細胞を播種・培養した。別途、細胞を播種する直前に、遊離のGRGDS Pペプチド0.25~4.0 mg/mlを細胞懸濁液に添加し、以下、上記と同様に培養後、吸光度を測定した。その結果を、図17に示す。実施例19と同様に、遊離のGRGDS P濃度の増加と共に、細胞接着は次第に阻害され、1.0~4.0 mg/mlではほぼ完全に阻害された。このことは、実施例19と同様に、T2細胞は固相化されたGRGDS Pを介して特異的に結合・接着していることを示唆する。

15

実施例21（エタノールを含む水溶液に溶解した偽似マトリックスを風乾・固相化した培養皿へのT2細胞の接着、および遊離の当該ペプチドによる競争阻害）

実施例18と同様に、50%エタノールにMBAC/MAS T-AG 7.3およびFIB-1を溶解し、培養皿に風乾・固相化後、T2細胞を播種・培養した。別途、細胞を播種する直前に、遊離のAG 7.3またはFIB-1ペプチド0.25 mg/mlを細胞懸濁液に添加し、以下、上記と同様に培養後、吸光度を測定した。その結果を、図18に示す。固相化したAG 7.3およびFIB-1ペプチドに対して、T2細胞はFNを塗布した場合とほぼ同程度に接着した。また、遊離のAG 7.3ペプチドによって、細胞接着はほぼ完全に阻害された。固相化FIB-1ペ

25

プチドの場合、特にMAST-FIB-1の場合は、固相化したFIB-1量の低減と共に遊離のFIB-1ペプチドによる競争阻害がより有効に働いた。

- 5 実施例22（エタノールを含む水溶液に溶解したMBAC/MAST-FIB-1を風乾・固相化した後、抗FIB-1ペプチド抗体処理によるT2細胞の接着阻害）

実施例21と同様に、MBAC/MAST-FIB-1を50%エタノールで希釈して培養皿に注ぎ、風乾・固相化させた。T2細胞を播種  
10 する前に、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗FIB-1ポリクローナル抗体 $100\mu\text{l}$ を培養皿に注ぎ、4時間インキュベートして固相化FIB-1ペプチドに抗体を結合させた。対照には正常IgGで処理した後、実施例21と同様に培養、固定、染色した。その結果を、図19に示す。固相化FIB-1が $0.1-0.25\mu\text{g}/\text{well}$ で、抗体による細胞接着が特  
15 異的に阻害された。

#### 産業上の利用可能性

本発明によると、疎水結合性吸着ポリマーでコーティングしたシリコンウェルを使用することにより、細胞培養において、例えば、培養細胞  
20 伸展装置で通常行われている以上の過度の負荷を細胞に与えても、細胞は剥離することなく、良好に増殖することができる。

さらに、本発明によると、本発明の細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品は、細胞接着蛋白質を直接固相化した標品に比して構造的に安定で、細胞接着ペプチドは安価であることより、細胞接着蛋白質の代  
25 替標品として極めて有用である。また、細胞接着ペプチドの性能は代表的接着蛋白であるFNと比較して、十分な活性を有する。また、構造的

に安定でしかも安価な固相化 L N  $\alpha$  鎖 G 領域ペプチドは、L N 代替物質として極めて有効である。さらに、偽似マトリックスは完全化学合成することができる。生物由来の培養基質を使う場合には、プリオン、ウィルス、細菌等が製造過程で混入するリスクを排除するのは困難である。

- 5 しかし、完全合成品を使う場合には、この様なリスクを排除して人工組織や人工臓器を作製することができるので、製造上大変有利である。

## 請 求 の 範 囲

1. 分子内に疎水性を有する直鎖状骨格と蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基とを有している疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされていることを特徴とする細胞培養基質。
2. 細胞培養基質の基材が、生物性ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物または金属からなる請求の範囲 1 記載の細胞培養基質。
3. 生物性ポリマーが、コラーゲン、ゼラチン、セルロース、アガロース、アルギン酸、キチン、キトサン、または、生分解性ポリマーのポリ乳酸、ポリブチレンサクシネート、ポリカプロラクトンである請求の範囲 2 記載の細胞培養基質。
4. プラスチックが、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂である請求の範囲 2 記載の細胞培養基質。
5. 熱可塑性樹脂が、アクリル樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリメチルペンテン樹脂またはフッ素樹脂である請求の範囲 4 記載の細胞培養基質。
6. 熱硬化性樹脂が、フェノール樹脂、尿素樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂またはシリコン樹脂である請求の範囲 4 記載の細胞培養基質。
7. 合成ゴムが、ブタジエンスチレンゴム、ブタジエンアクリロニトリルゴム、ブチルゴム、多硫化系合成ゴム、フッ素ゴムまたはシリコンゴムである請求の範囲 2 記載の細胞培養基質。
8. 無機物が、ガラス、ヒドロキシアパタイト、IC 基材またはカーボンナノチューブである請求の範囲 2 記載の細胞培養基質。
9. 金属が、不活性 (i n e r t) な金、白金、チタン、インジウム、または、これらの酸化物である酸化チタン、酸化インジウム、ITO (酸

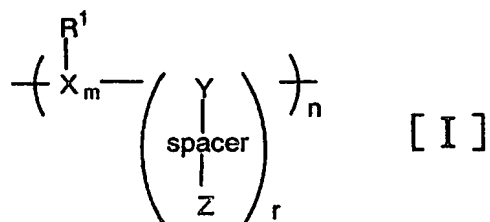
化インジウム・スズ) である請求の範囲 2 記載の細胞培養基質。

10. 請求の範囲 2 ～ 9 記載の基材からなる細胞培養基質が、培養皿(ウェル)、プリント配線板または人工臓器である請求の範囲 1 記載の細胞培養基質。

5 11. 人工臓器が、人工血管、人工心肺または人工腎臓である請求の範囲 10 記載の細胞培養基質。

12. 細胞培養基質が、シリコンゴムを基材とした培養皿(ウェル)である請求の範囲 1 または 10 記載の細胞培養基質。

10 13. 疎水結合性吸着ポリマーが、以下の式 [I] で表される請求の範囲 1 ～ 12 のいずれか記載の細胞培養基質。



(式中、Xは、CHまたはNHCHCOを示し、Yは、CHまたはNH  
CR<sup>2</sup>COを示し、R<sup>1</sup>は、H、炭素数1～10のアルキル基、炭素数1  
～10のアルコキシ基、炭素数6～10のアリールもしくはアラアルキ  
15 ル基または炭素数6～10のアリールオキシもしくはアラアルキルオキ  
シ基を示し、R<sup>2</sup>は、Hまたは炭素数1～10のアルキル基を示し、Z  
は、官能基(反応基)を示し、Xと互に結合してもよく、spacerは、(—  
CH<sub>2</sub>—)<sub>p</sub> または(—NHCHR<sup>3</sup>CO—)<sub>q</sub> を示し、R<sup>3</sup>は、Hまたは炭  
素数1～10のアルキル基を示し、mは、1以上の整数を、nは、10  
20 0～20000の整数を、pおよびqは、独立して0または1～8の整  
数を、rは、1以上の整数を示す)

14. 式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーが、ビニル系化合物と無水マレイン酸との共重合体である請求項13記載の細胞培養基質。

15. ビニル系化合物が、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、ブチルエーテル、ヘキシルビニルエーテルまたはスチレンである請求の範囲14記載の細胞培養基質。

16. 細胞接着蛋白質またはペプチドが、請求の範囲1～15のいずれか記載の細胞培養基質に結合していることを特徴とする細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品。

10 17. 結合が、疎水結合性吸着ポリマー分子内の蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドの反応性基とが反応し形成される共有結合である請求の範囲16記載の固相化標品。

18. 共有結合が、アミド結合である請求の範囲17記載の固相化標品。

15 19. 細胞接着蛋白質が、フィブロネクチン (FN)、コラーゲン (Col)、ラミニン (LN) またはビトロネクチン (VN) である請求の範囲16～18のいずれか記載の固相化標品。

20. 細胞接着ペプチドが、請求の範囲19記載の細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドである請求の範囲16～18記載の固相化標品。

20 21. フィブロネクチン (FN) 蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドが、細胞側のインテグリン受容体と結合する特異的なArg-Gly-Asp (RGD) アミノ酸配列を有するペプチドである請求の範囲20記載の固相化標品。

25 22. RGDアミノ酸配列を有するペプチドが、Tyr-Ala-Val-Ile-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser (FIB-1) である請求の範囲21記載の固相化標品。

23. ラミニン (LN) 蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドが、



$\alpha$ 鎖のG領域 (G-domain) ペプチドである請求の範囲20記載の固相化標品。

24. G領域ペプチドが、Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (AG73)、  
5 Leu-Gln-Gln-Arg-Arg-Ser-Val-Leu-Arg-Thr-Lys-Ile (AG73T)、Thr-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Gly-Arg-Leu-His-Phe-Met (AG76.8)、Thr-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Gly-Arg-Leu-His-Phe-Nle (AG7  
10 6.8X)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Met (AG81.2)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Nle (AG81.2X)、Lys-Asn-Arg-Leu-Thr-Ile-Glu-Leu-Glu-Val-Arg-  
15 Thr (A2G73)、Lys-Pro-Arg-Leu-Gln-Phe-Ser-Leu-Asp-Ile-Gln-Thr (A3G72)、Lys-Phe-Leu-Glu-Gln-Lys-Ala-Pro-Arg-Asp-Ser-His (A4G73)、Gly-Glu-Lys-Ser-Gln-Phe-Ser-Ile-Arg-Leu-Ly  
20 s-Thr (A4G78)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (A4G82)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Nle (A4G82X)、Gly-Pro-Leu-Pro-Ser-Tyr-Leu-Gln-Phe-Val  
25 -Gly-Ile (A5G71)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Met-Leu-Val-Arg-Pro (A

- 5 G 7 3), Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Nle-Leu-Val-Arg-Pro (A 5 G 7 3 X), Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His-Phe-Val-Ala (A 5 G 7 7), Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His (A 5 G 7 7 f), Lys-Asn-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Tyr-Leu-Ser-Lys-Gly (h A 3 G 7 5) または Gly-Asn-Ser-Thr-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Tyr (h A 3 G 8 3) である請求の範囲 2 3 記載の固相化標品。
- 10 2 5. 細胞接着ペプチドが、3～20個のアミノ酸残基からなるペプチドである請求の範囲 2 0 記載の固相化標品。
- 2 6. 細胞培養基質にコーティングした疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドとを反応させることを特徴とする固相化標品の製造方法。
- 15 2 7. 疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドとを反応させ、該反応物を細胞培養基質にコーティングすることを特徴とする固相化標品の製造方法。
- 2 8. 疎水結合性吸着ポリマーの蛋白質またはペプチドと反応しうる官能基と細胞接着蛋白質またはペプチドとを反応させて得られる反応物。
- 20 2 9. 請求の範囲 1 6～2 7 のいずれか記載の細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品上に目的とする細胞を播種し、培養することにより調製されることを特徴とする人工組織。
- 3 0. 目的とする細胞が、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞である請求の範囲 2 9 記載の人工組織。
- 25 3 1. 上皮細胞が、表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞または肝実質細胞である請求の範

図 3 0 記載の人工組織。

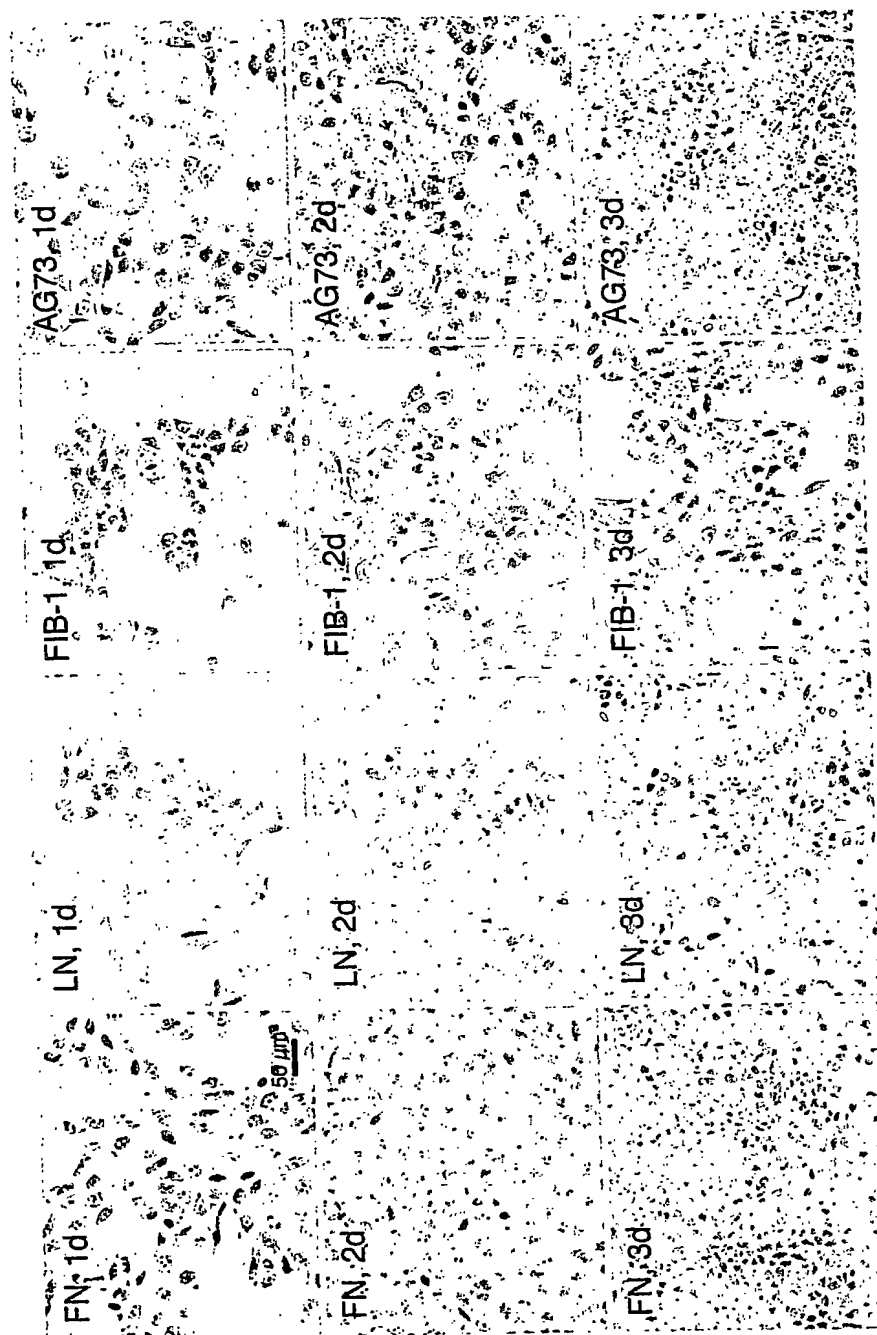
3 2. 内皮細胞が、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞または大動脈血管内皮細胞である請求の範囲 3 0 記載の人工組織。

5    3 3. 間充織細胞が、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞または神経細胞（ニューロン）である請求の範囲 3 0 記載の人工組織。

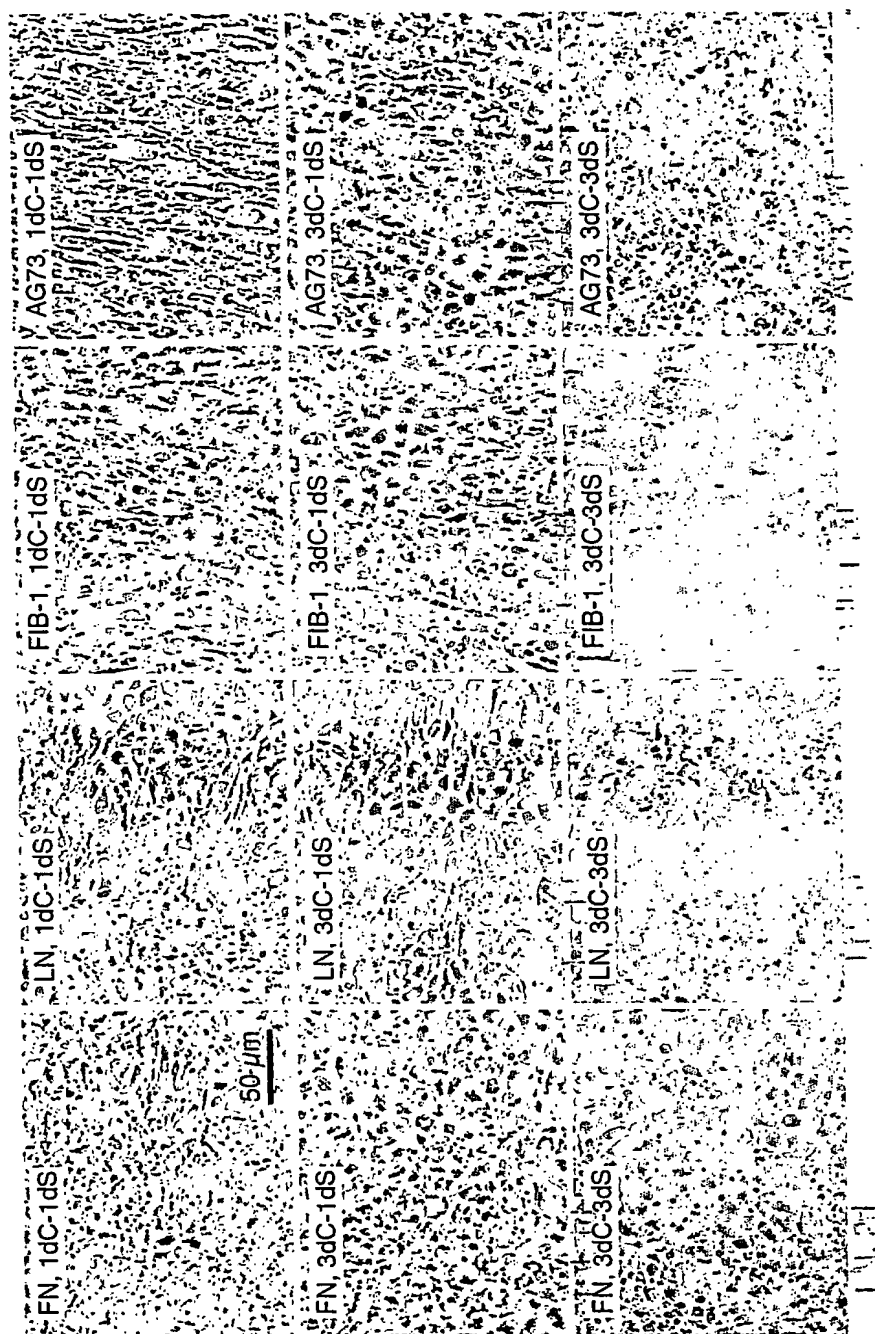
3 4. 人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織もしくは人工血管内皮組織、または人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚もしくは人工角膜である請求の範囲 2 9 ～ 3 3 のいずれか記載の人工組織。

10

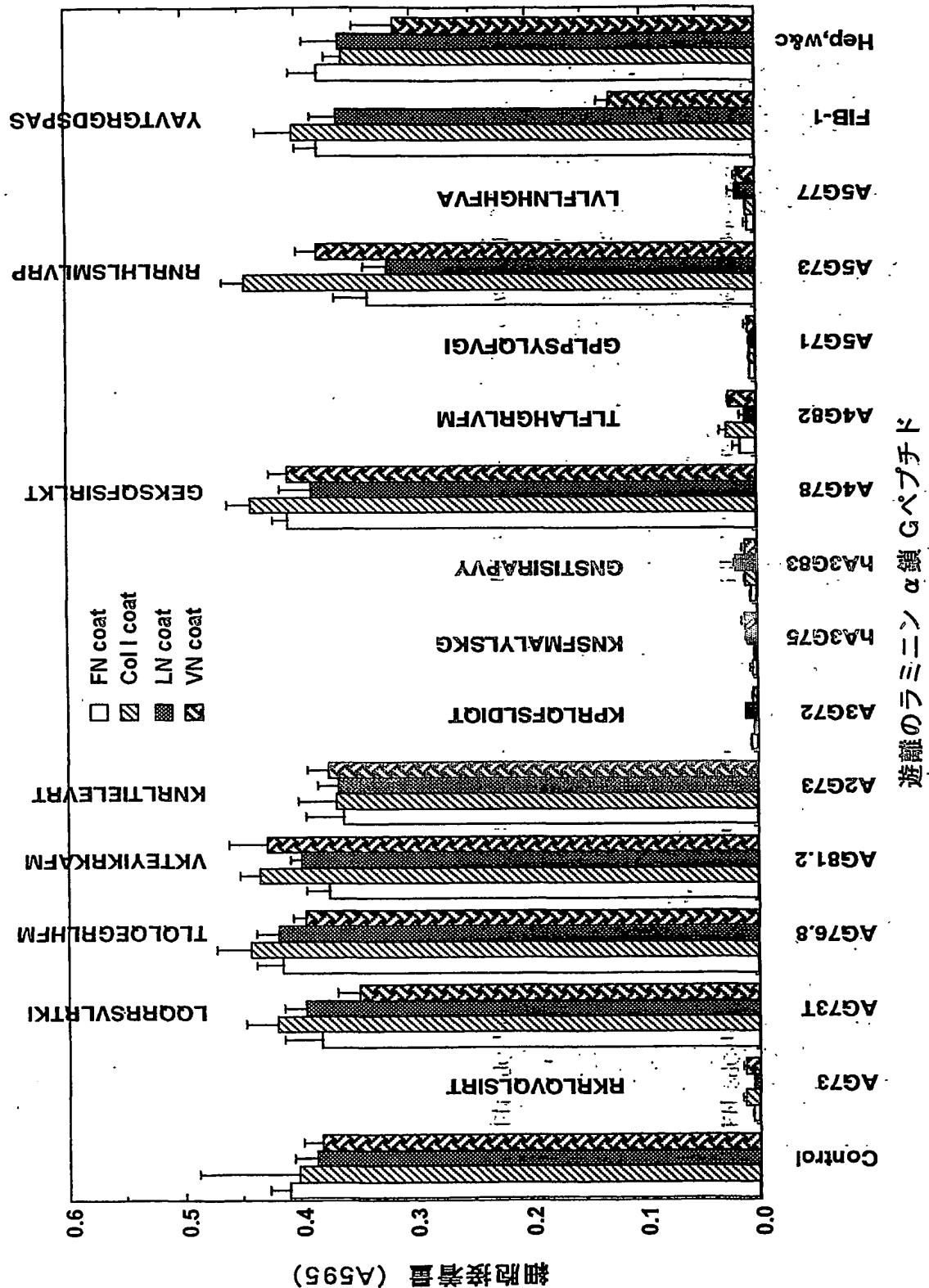
## 第 1 図



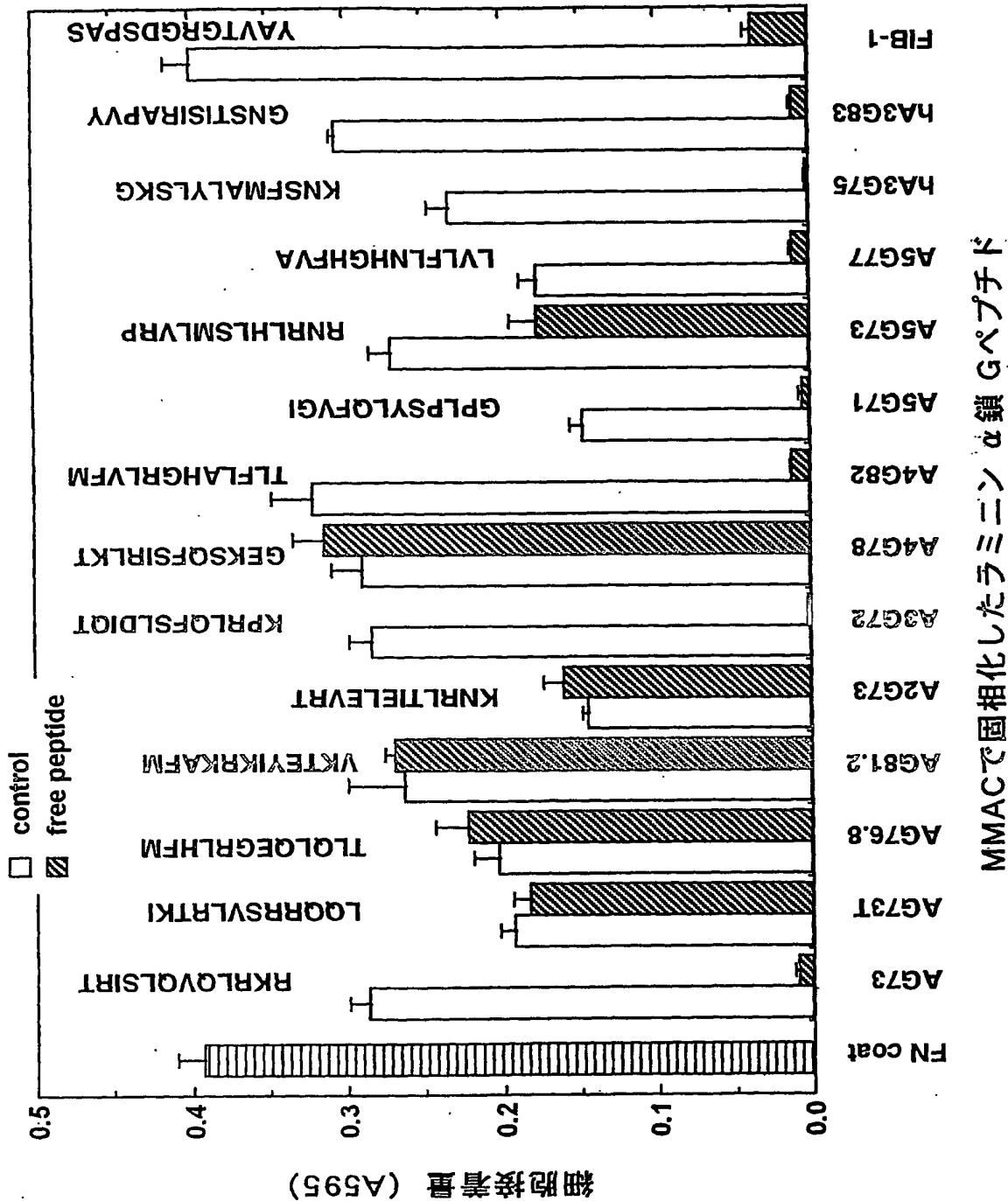
第 2 図



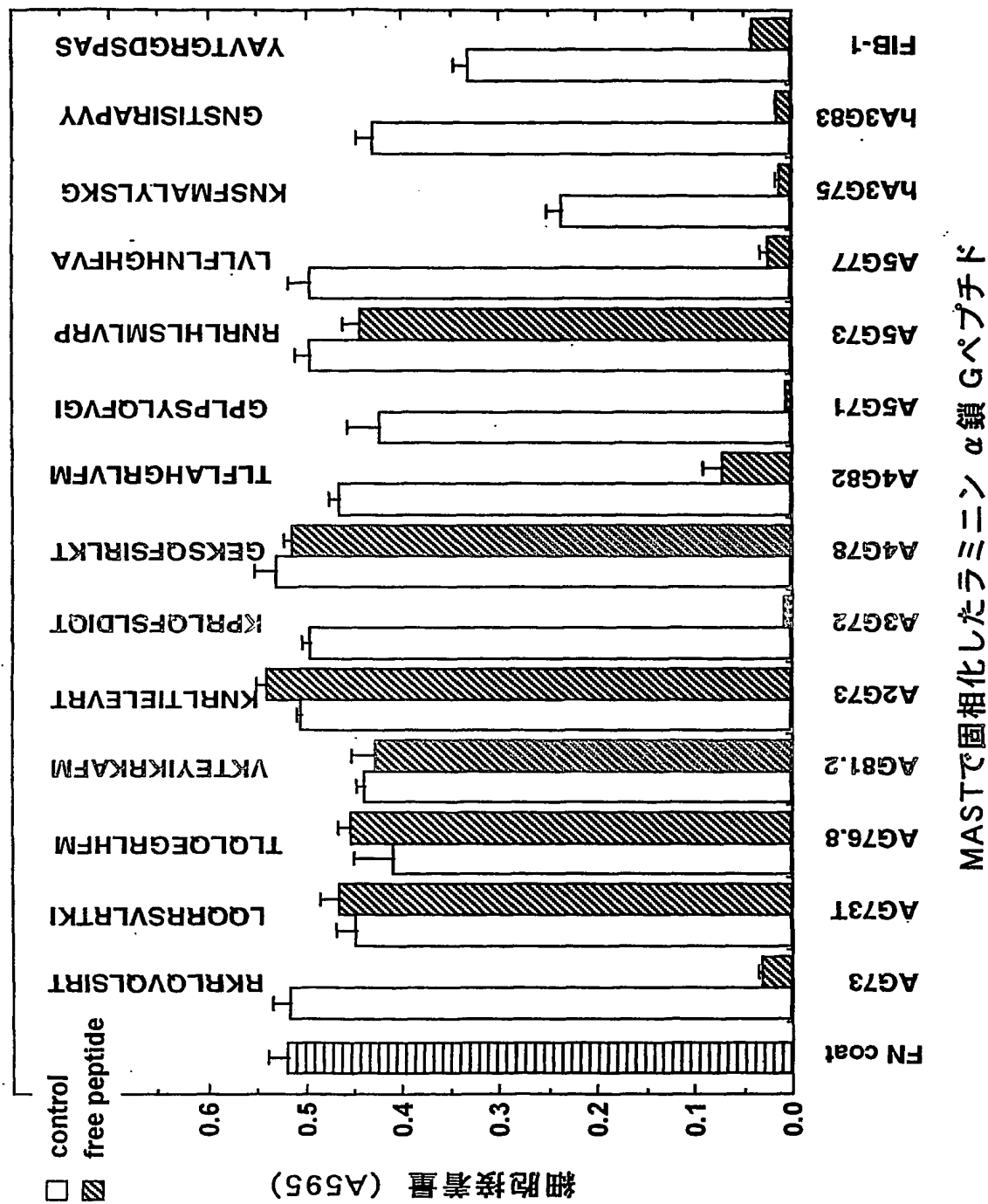
第 3 図



第 4 図



第 5 図

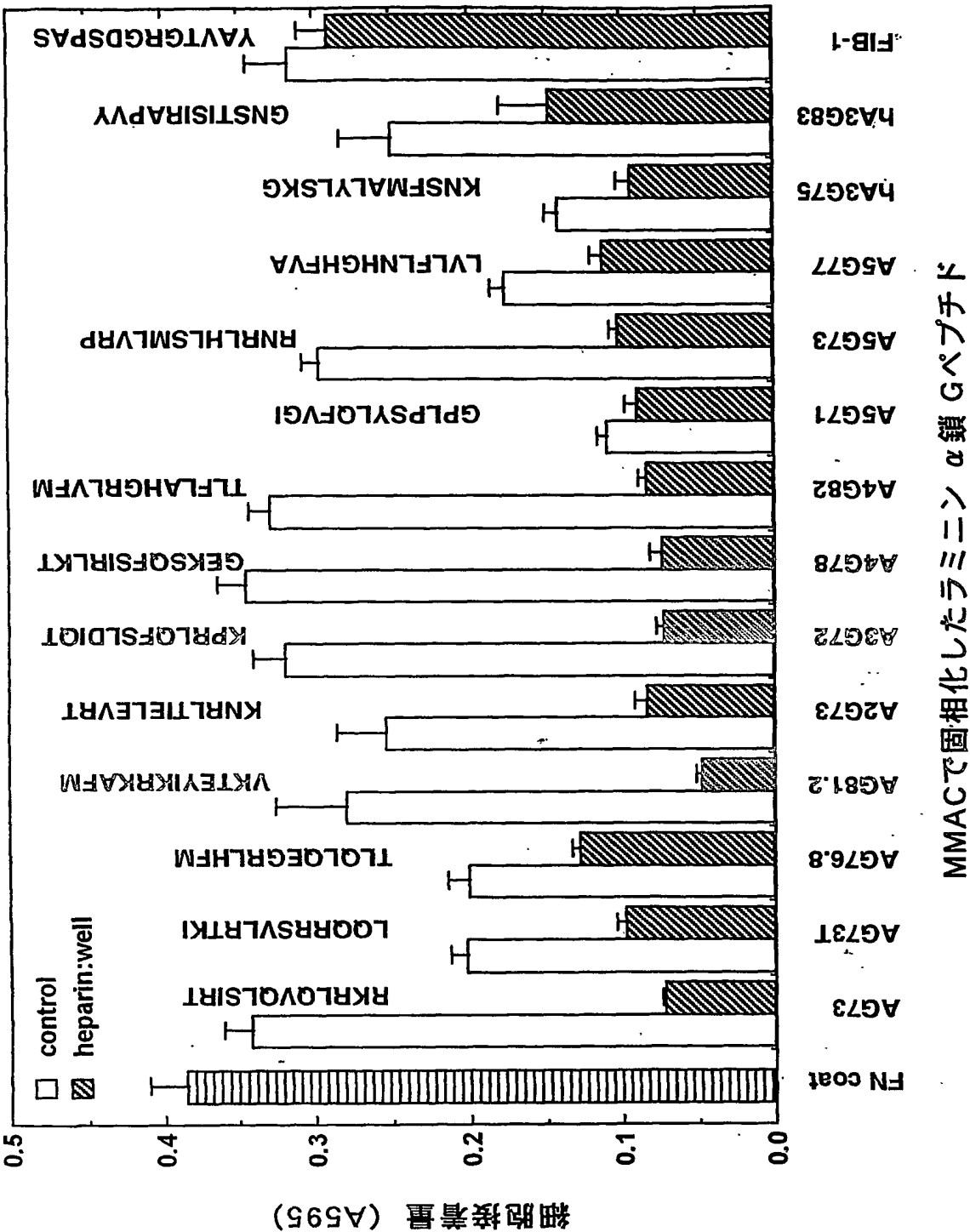




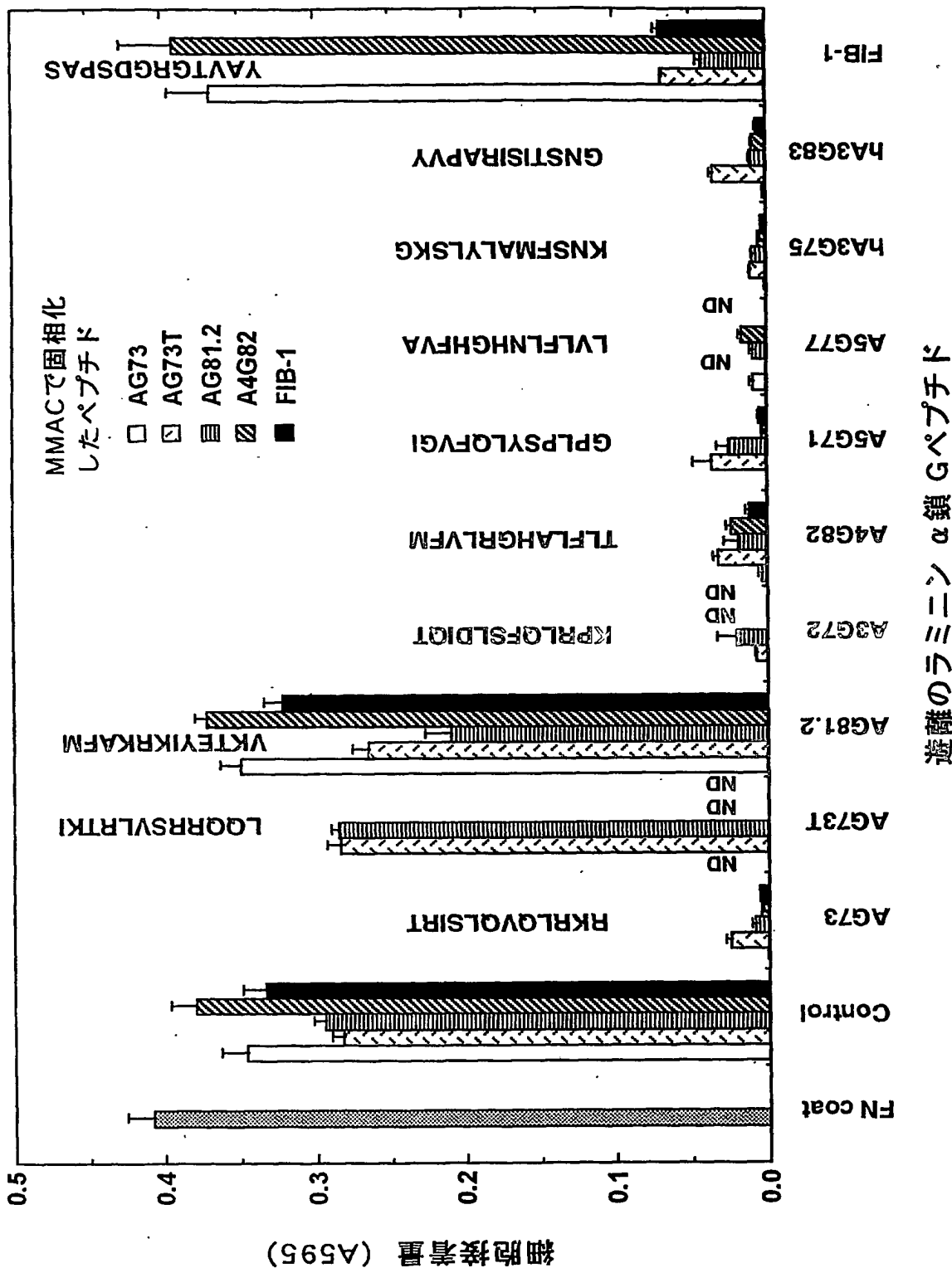
第 6 図



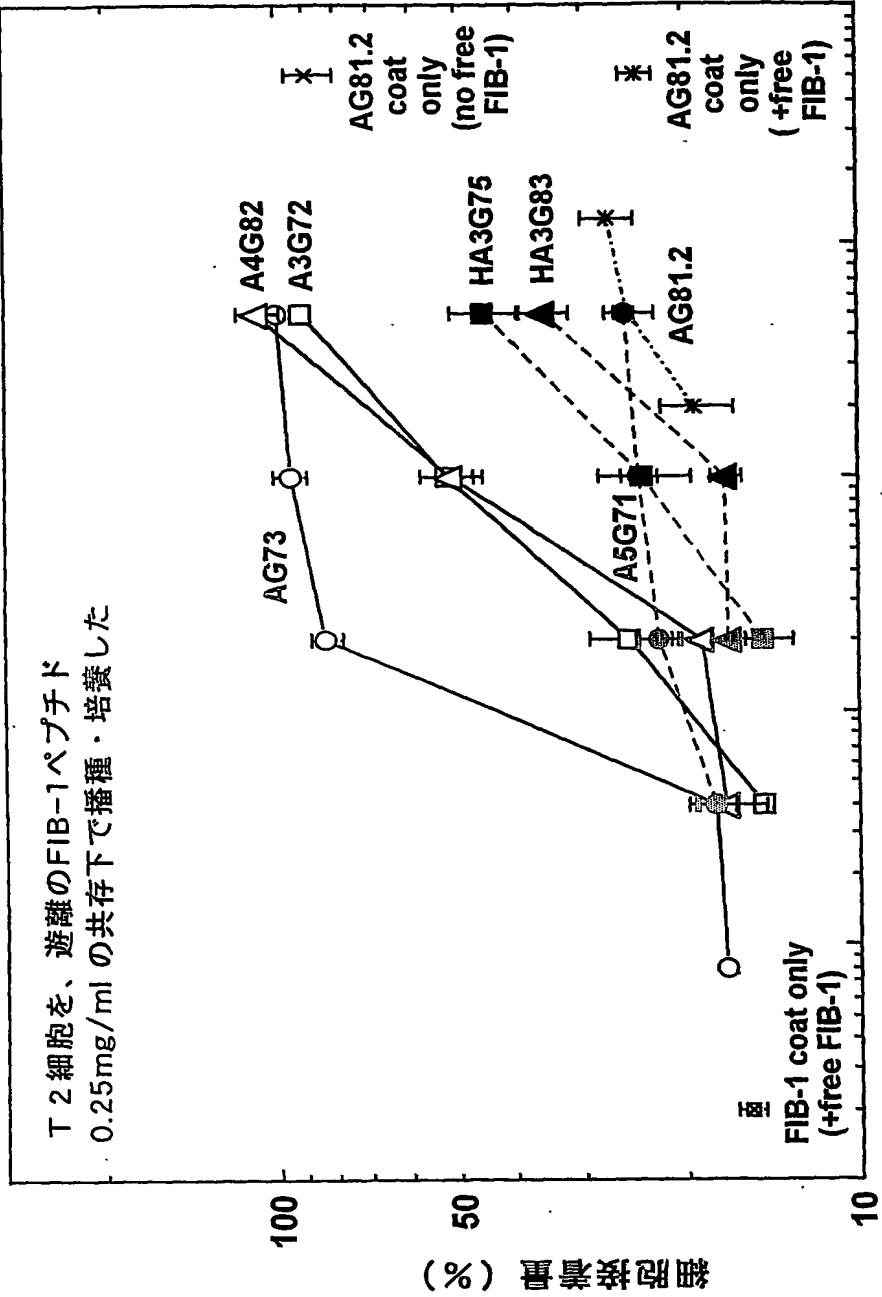
第 7 図



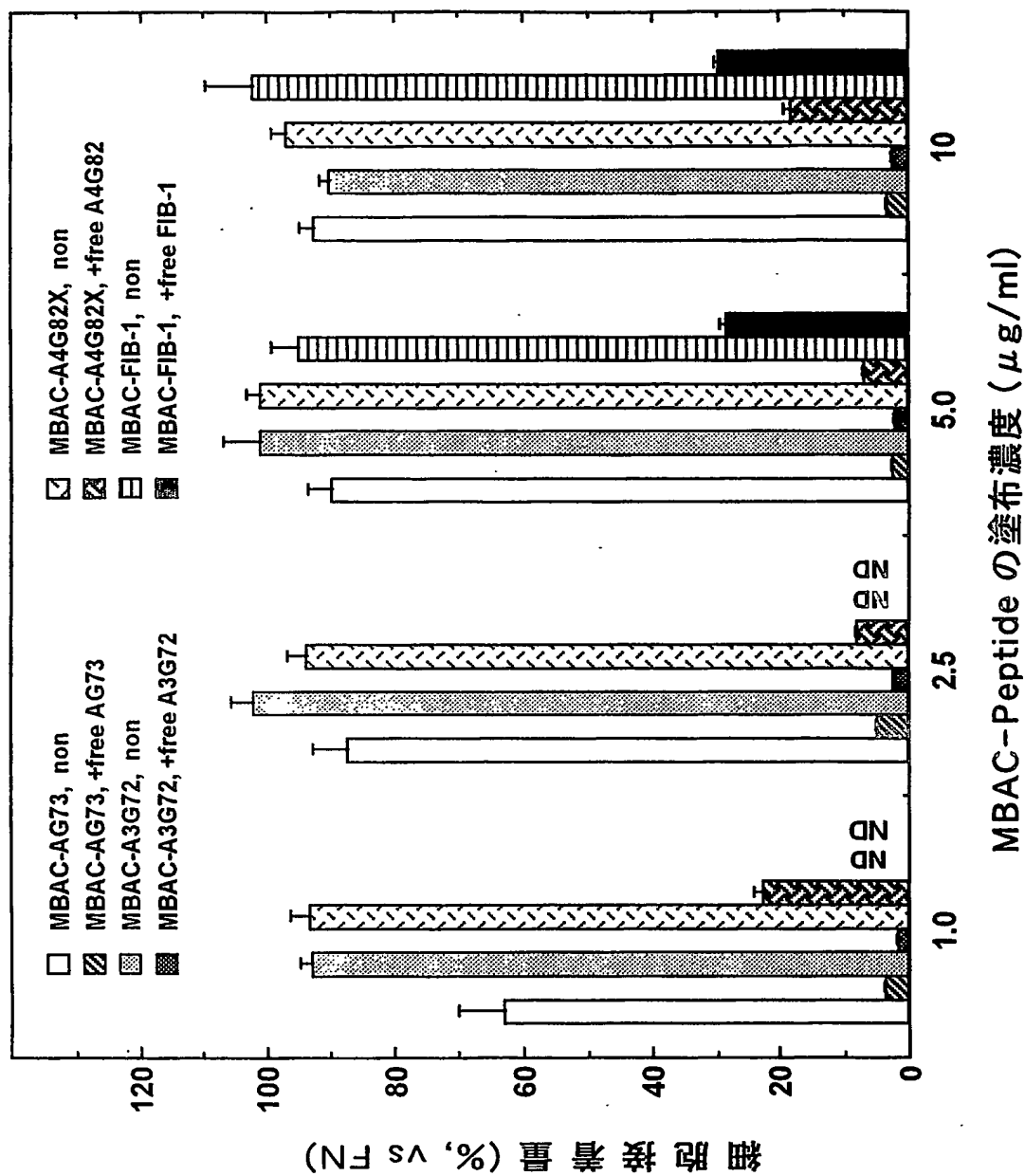
第 8 図



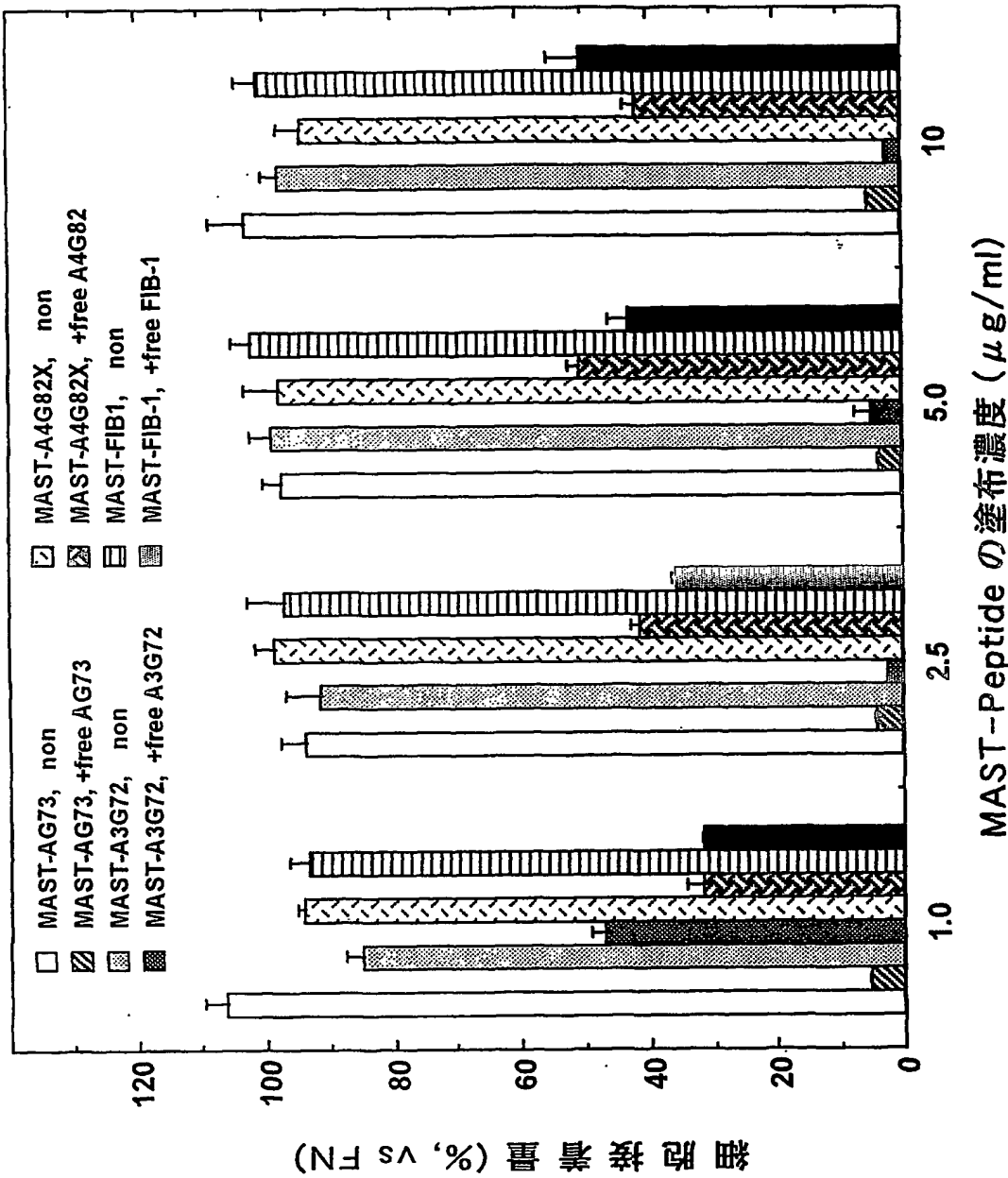
第 9 図



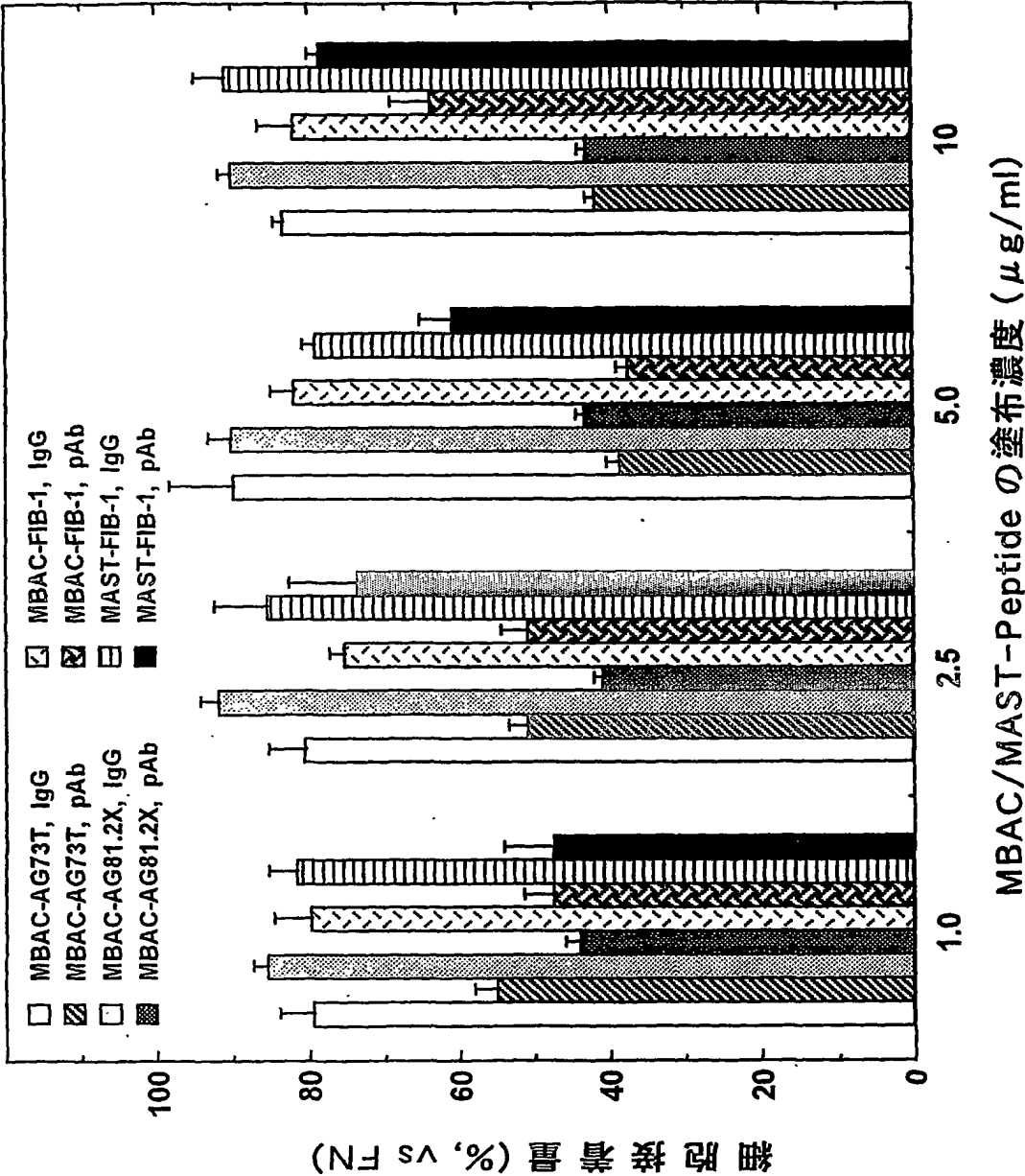
第 10 図



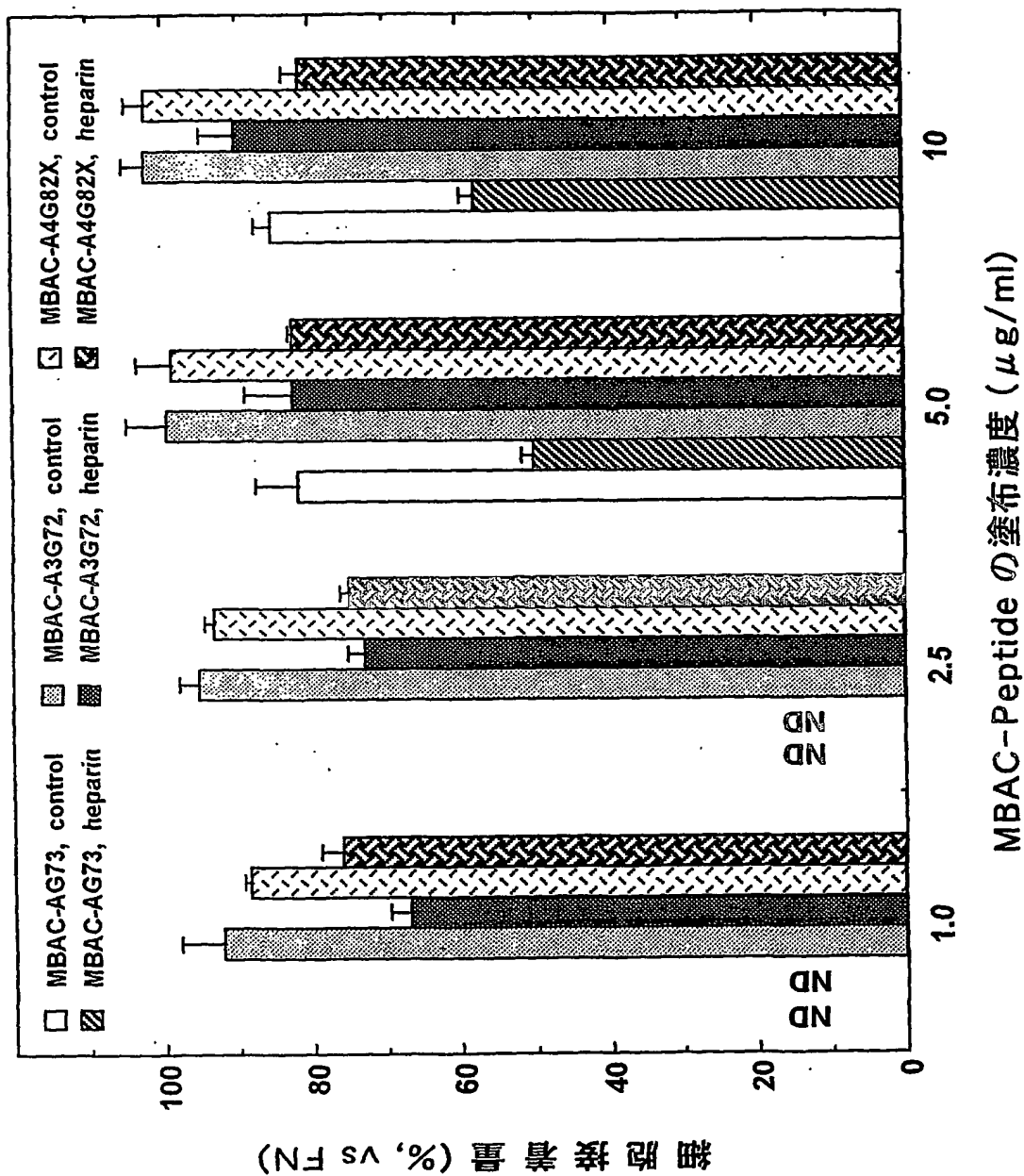
第 11 図



第 12 図

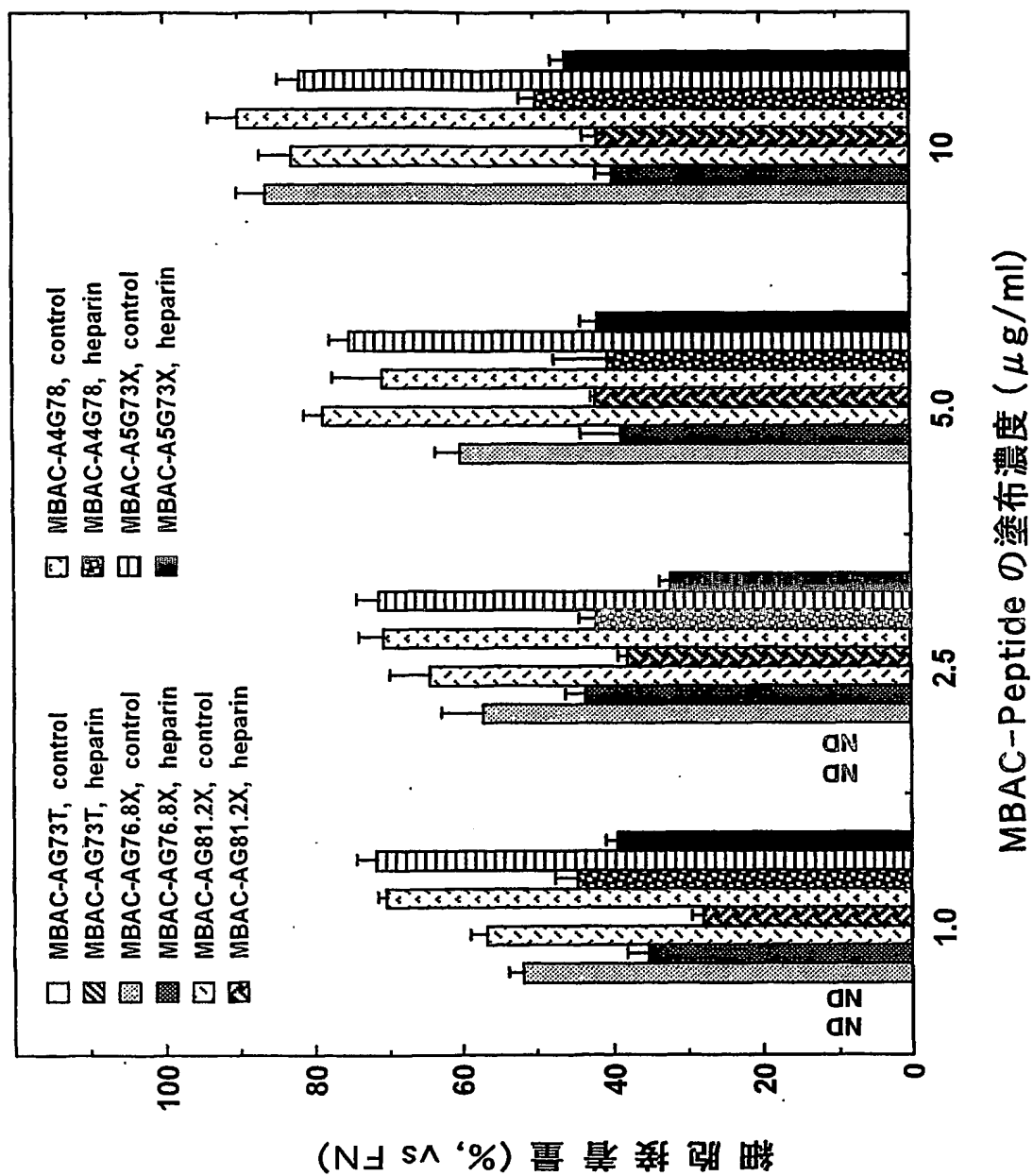


第 13 図

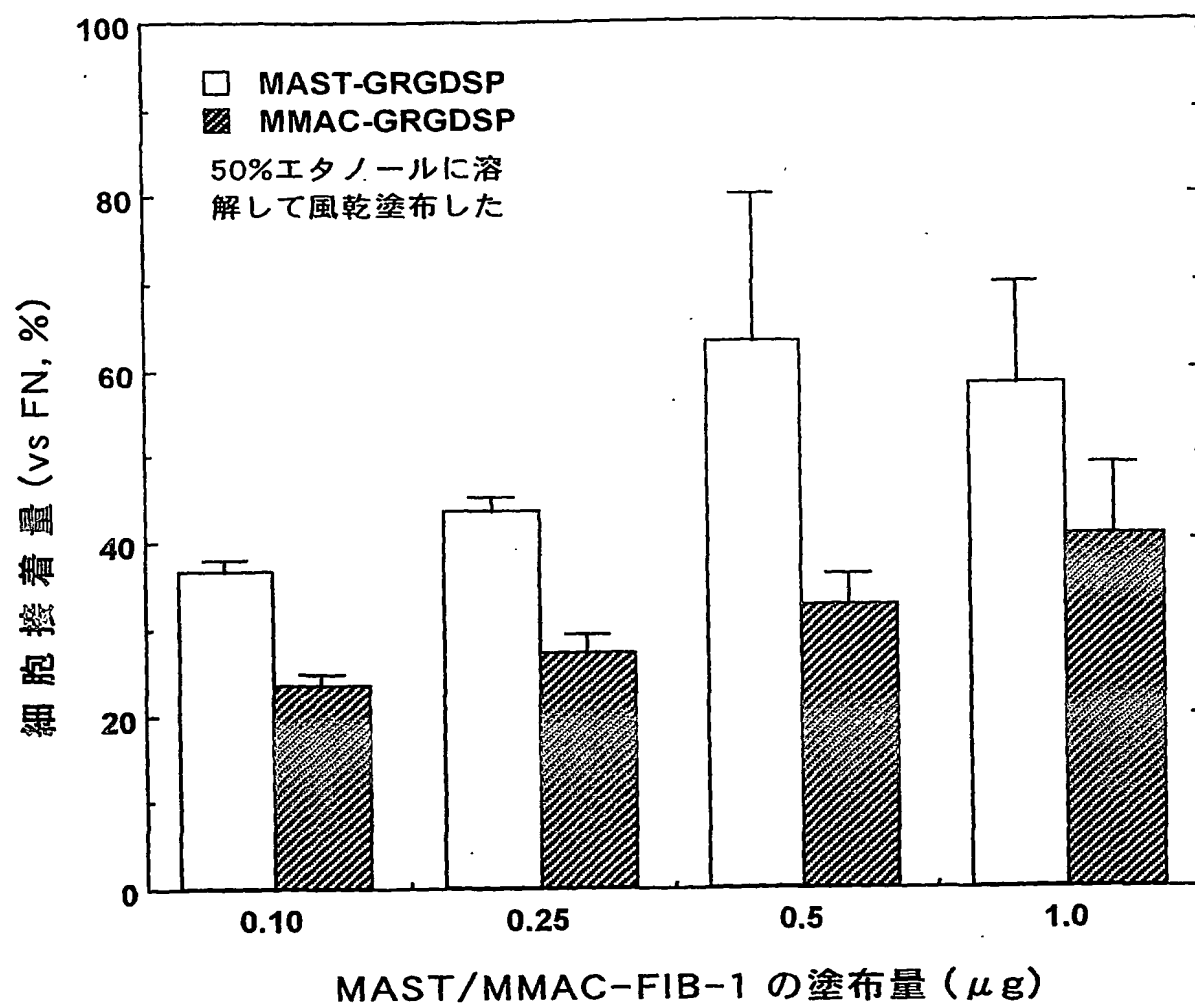




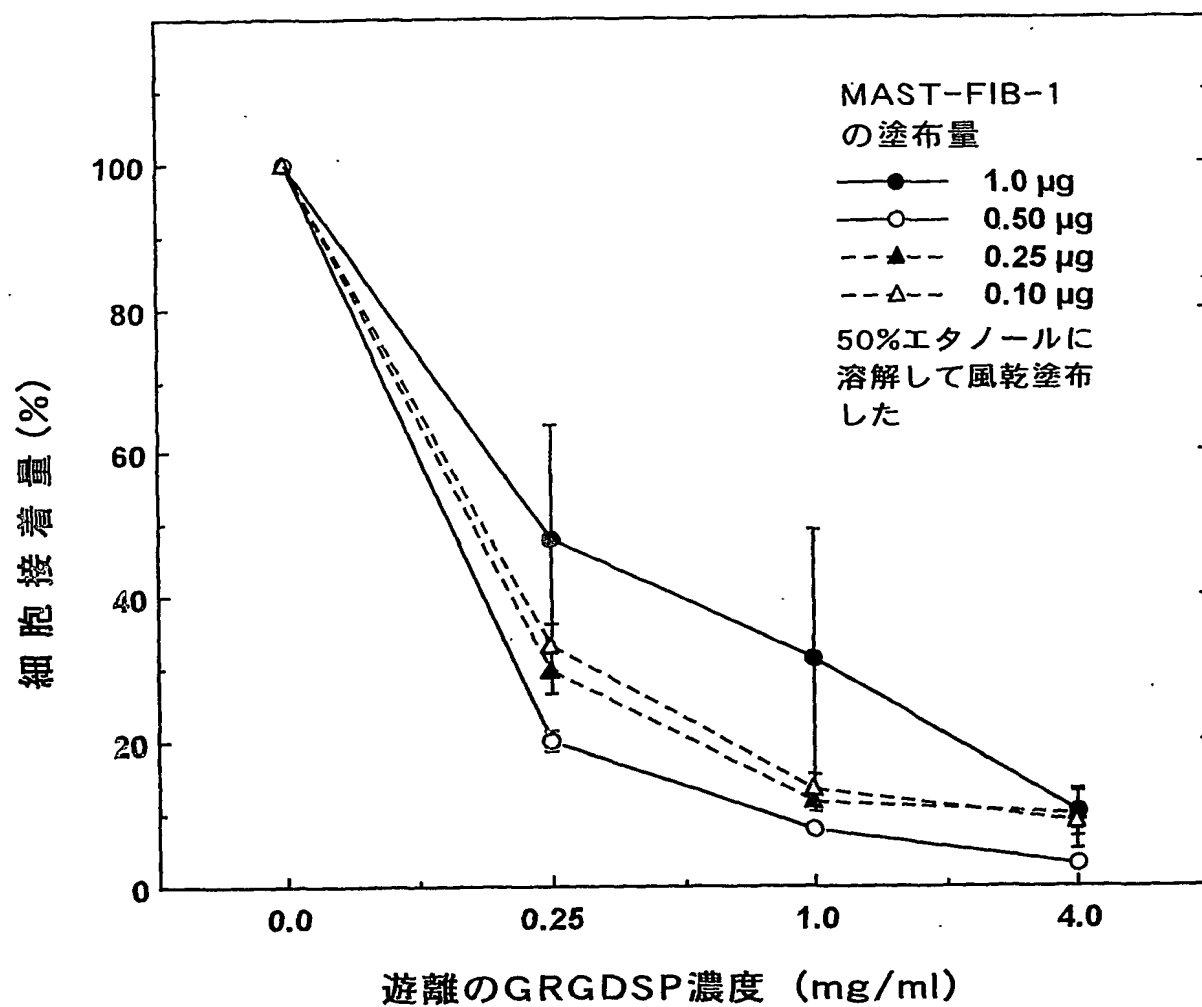
第 14 図



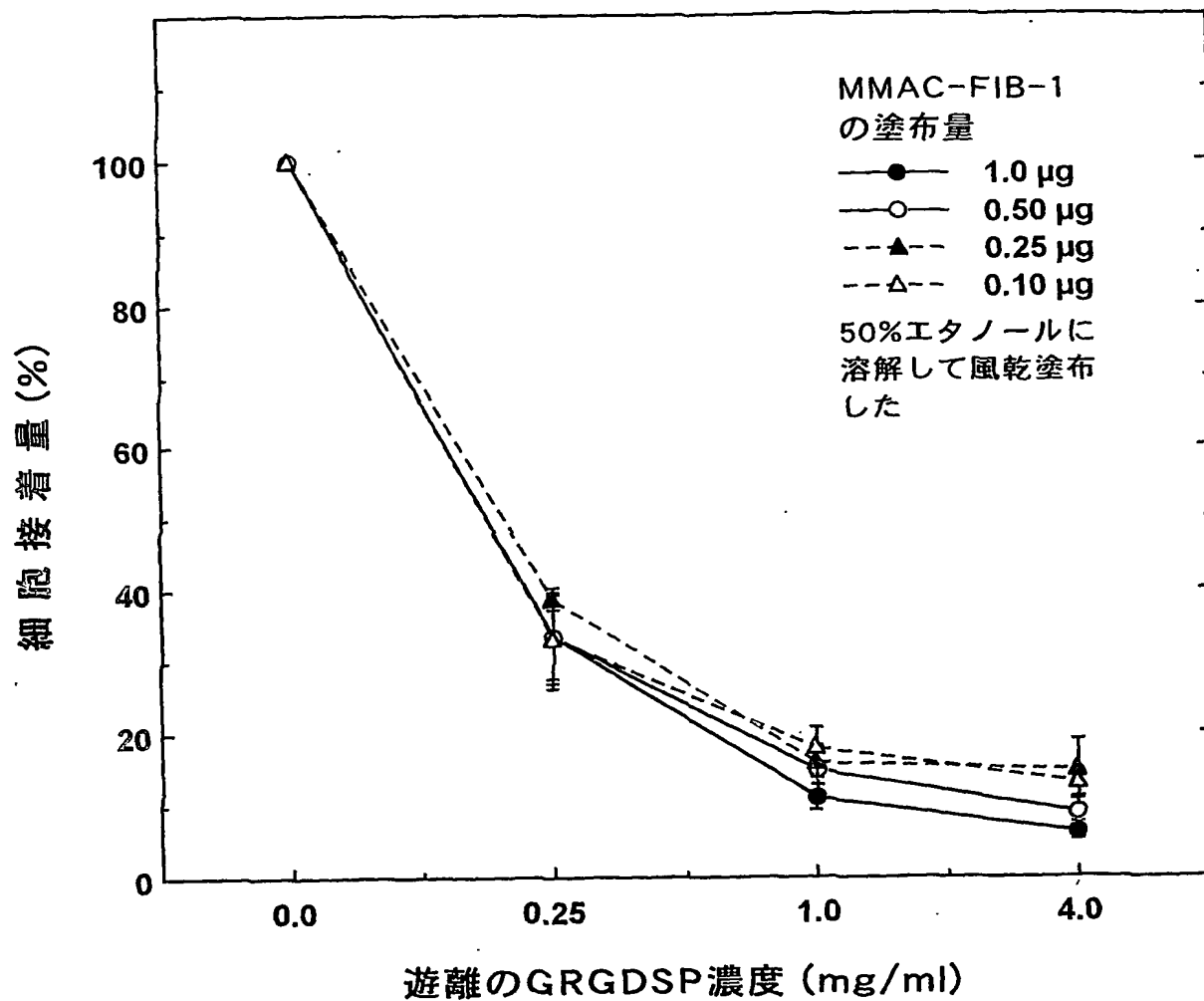
第 15 図



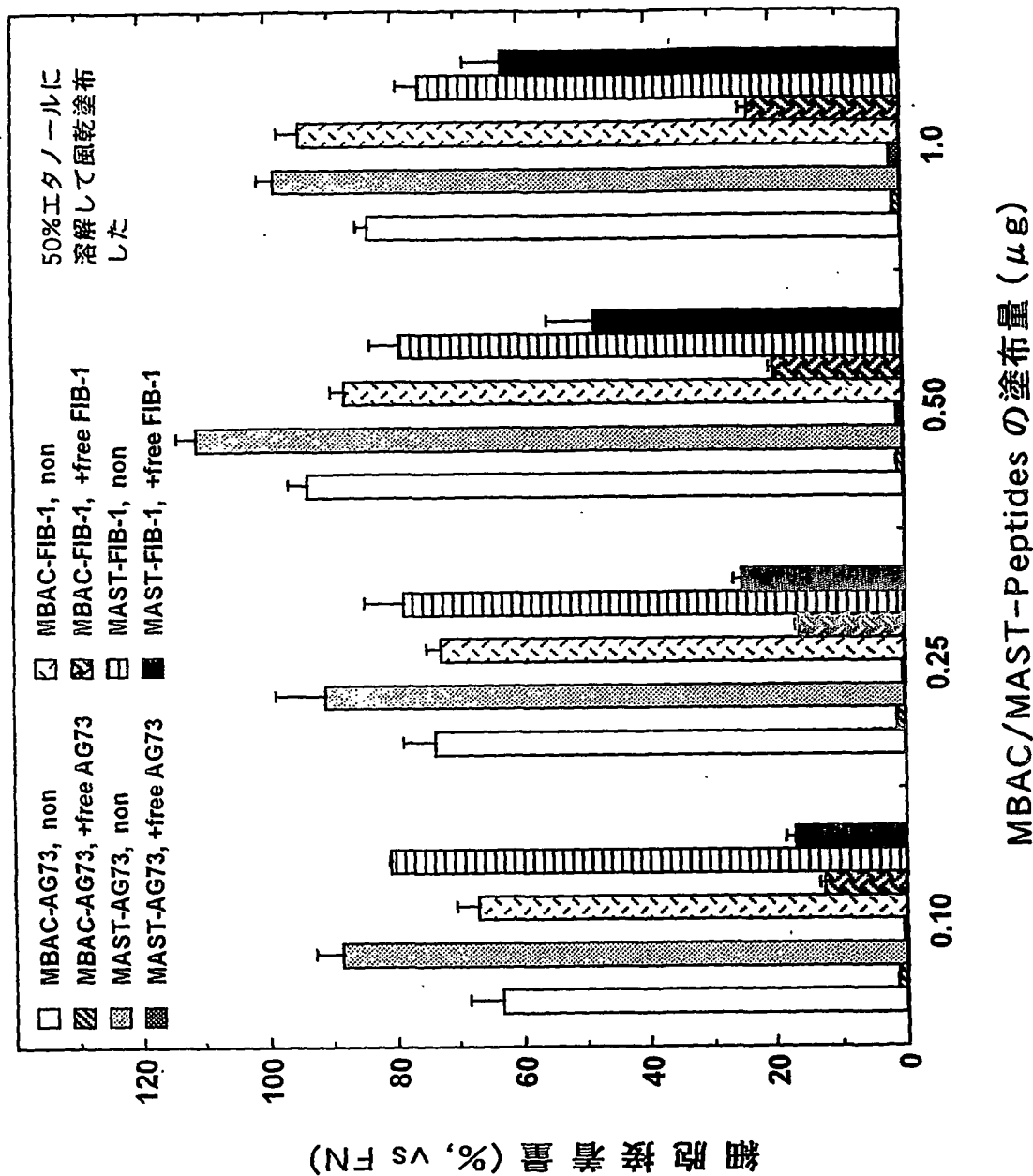
第 16 図



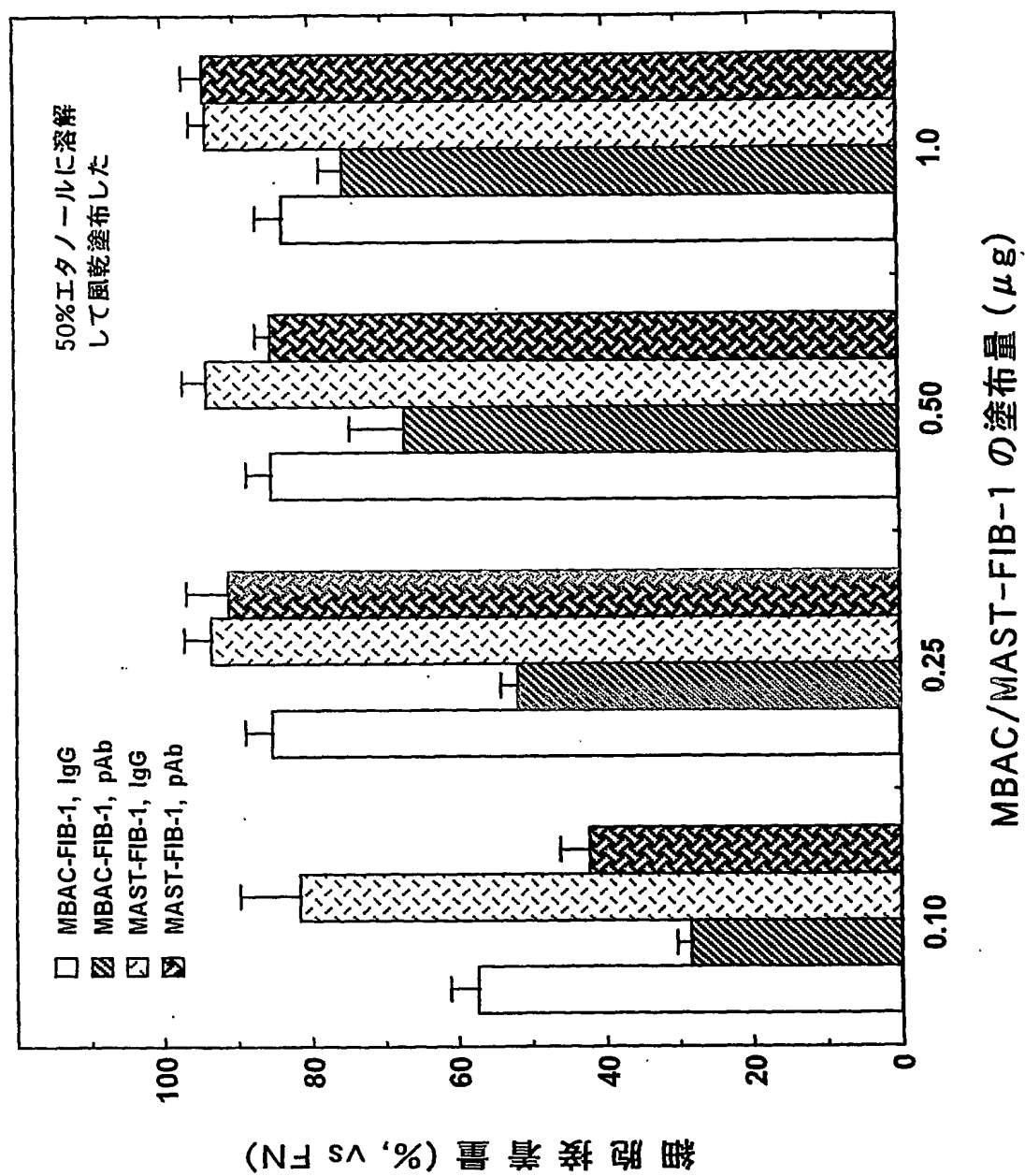
## 第 17 図



第 18 図



第 19 図



## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute for Environmental Studies

MOCHITATE, Katsumi

<120> Cell Culture Substrate and Solid Phase Sample of Cell Adhesive Peptide or Protein

<130> 2004C2032PCT

<150> JP2003-81147

<151> 2003-03-24

<150> JP2003-81148

<151> 2003-03-24

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Arg Lys Arg Leu Gln Val Gln Leu Ser Ile Arg Thr

1

5

10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Leu Gln Gln Arg Arg Ser Val Leu Arg Thr Lys Ile  
1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Val Lys Thr Glu Tyr Ile Lys Arg Lys Ala Phe Met  
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Nle

<400> 4

Val Lys Thr Glu Tyr Ile Lys Arg Lys Ala Phe Xaa  
1 5 10

<210> 5

<211> 12



<212> PRT

<213> mouse

<400> 5

Lys Asn Arg Leu Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr  
1                      5                      10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<400> 6

Lys Pro Arg Leu Gln Phe Ser Leu Asp Ile Gln Thr  
1                      5                      10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<400> 7

Thr Leu Phe Leu Ala His Gly Arg Leu Val Phe Met  
1                      5                      10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12).. (12)

<223> Nle

<400> 8

Thr Leu Phe Leu Ala His Gly Arg Leu Val Phe Xaa  
1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<400> 9

Gly Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Gln Phe Val Gly Ile  
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<400> 10

Arg Asn Arg Leu His Leu Ser Met Leu Val Arg Pro  
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Nle

<400> 11

Arg Asn Arg Leu His Leu Ser Xaa Leu Val Arg Pro

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<400> 12

Leu Val Leu Phe Leu Asn His Gly His Phe Val Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> mouse

<400> 13

Leu Val Leu Phe Leu Asn His Gly His

1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Lys Asn Ser Phe Met Ala Leu Thr Tyr Ser Lys Gly  
1                      5                      10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Asn Ser Thr Ile Ser Ile Arg Ala Pro Val Tyr  
1                      5                      10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser  
1                      5                      10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004077

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12M3/00, C12M1/22, C12N5/00, A61L27/38, 27/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12M3/00, C12M1/22, C12N5/00, A61L27/38, 27/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-65246 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 05 March, 2002 (05.03.02),	1, 2, 4-6, 10, 13
Y	Full text (Family: none)	2-13
X	JP 2-501529 A (Banes, Albert J.), 31 May, 1990 (31.05.90),	1, 2, 4, 5, 10, 11
Y	Full text & WO 88/08789 A & EP 365536 A & US 4789601 A & DE 3855631 A	2-12
X	JP 5-285217 A (Unitika Ltd.), 02 November, 1993 (02.11.93),	1, 2, 4, 10, 13-15
Y	Full text (Family: none)	2-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 July, 2004 (02.07.04)Date of mailing of the international search report  
27 July, 2004 (27.07.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004077

## Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 7-222920 A (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.), 22 August, 1995 (22.08.95), Full text (Family: none)	1-9 2-12
X Y	JP 5-209072 A (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.), 20 August, 1993 (20.08.93), Full text (Family: none)	1-12 2-11
X Y	JP 2002-263183 A (Asahi Kasei Corp.), 17 September, 2002 (17.09.02), Full text (Family: none)	1,2,4,5,8, 10,11 2-12
Y	JP 5-176761 A (Biomaterial Research Institute Co., Ltd.), 20 July, 1993 (20.07.93), Full text (Family: none)	1-15
A	JP 7-191034 A (Unitika Ltd.), 28 July, 1995 (28.07.95), (Family: none)	1-15
A	JP 8-94621 A (Unitika Ltd.), 12 April, 1996 (12.04.96), (Family: none)	1-15
A	JP 10-110104 A (Toyo Ink Manufacturing Co., Ltd.), 28 April, 1998 (28.04.98), (Family: none)	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/004077

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

No common matter can be found out among the cell culture media as set forth in claims 1 to 15, the solidified preparations as set forth in claims 16 to 25, the processes for producing a solidified preparation as set forth in claims 26 and 27, the reaction product as set forth in claim 28 and the artificial tissues as set forth in claims 29 to 34.

It is recognized the cell culture media coated with a hydrophobic bonding adsorptive polymer, being a matter common to the cell culture media as set forth in claims 1 to 15, the solidified preparations as set forth in claims 16 to 25, the processes for producing a solidified preparation as set forth in claims 26 and 27 and the artificial (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1 to 15

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004077

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

tissues as set forth in claims 29 to 34, have been publicly known (see, if needed, JP 2002-65246 A, Sumitomo Bakelite Co., Ltd. 2002.03.05) and, therefore, cannot be regarded as involving a special technical feature.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 34 cannot be considered as a group so linked as to form a single general inventive concept. Thus, claims 1 to 34 are classified into the following 4 groups of inventions: the cell culture media as set forth in claims 1 to 15, the solidified preparations as and the processes for producing the same as set forth in claims 16 to 27, the reaction product as set forth in claim 28 and the artificial tissues as set forth in claims 29 to 34.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M3/00, C12M1/22, C12N5/00, A61L27/38, 27/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12M3/00, C12M1/22, C12N5/00, A61L27/38, 27/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
WPIDS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2002-65246 A (住友ベークライト株式会社) 2002.03.05, 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 4-6, 10, 13 2-13
X Y	JP 2-501529 A (ベインズ, アルバート ジェー) 1990.05.31, 全文 & WO 88/08789 A & EP 365536 A & US 4789601 A & DE 3855631 A	1, 2, 4, 5, 10, 11 2-12
X Y	JP 5-285217 A (ユニカ株式会社) 1993.11.02, 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 10, 13-15 2-15
X Y	JP 7-222920 A (日本合成ゴム株式会社) 1995.08.22, 全文 (ファミリーなし)	1-9 2-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.07.2004

国際調査報告の発送日

27.7.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中晴絵

4N

9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 5-209072 A(日本合成ゴム株式会社)1993. 08. 20, 全文 (ファミリーなし)	1-12 2-11
X Y	JP 2002-263183 A(旭化成株式会社)2002. 09. 17, 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5, 8, 10, 11 2-12
Y	JP 5-176761 A(株式会社バ イオマテリアル研究所)1993. 07. 20, 全文 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 7-191034 A(ユニチカ株式会社)1995. 07. 28 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 8-94621 A(ユニチカ株式会社)1996. 04. 12 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 10-110104 A(東洋インキ製造株式会社)1998. 04. 28 (ファミリーなし)	1-15

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-15記載の細胞培養基質、請求の範囲16-25記載の固相化標品、請求の範囲26、27記載の固相化標品の製造方法、請求の範囲28記載の反応物、請求の範囲29-34記載の人工組織について、これら全てに共通する事項を見出すことはできない。

そして、請求の範囲1-15記載の細胞培養基質、請求の範囲16-25記載の固相化標品、請求の範囲26、27記載の固相化標品の製造方法、請求の範囲29-34記載の人工組織、に共通の事項である、疎水結合性吸着ポリマーでコーティングされている細胞培養基質は公知であったと認められ（要すれば、JP 2002-65246 A（住友ベークライト株式会社）2002.03.05 参照。）、これらは特別な技術的特徴を含むとは認められない。

よって、請求の範囲1-34に記載される発明は、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているとは認められない。請求の範囲1-34は、請求の範囲1-15記載の細胞培養基質、請求の範囲16-27記載の固相化標品、及びその製造方法、請求の範囲28記載の反応物、請求の範囲29-34記載の人工組織、に関する、4群に区分される。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-15

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。